



**UNIVERSIDADE NOVA DE
LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**



**Produção de *Virus Like Particles* (VLPs) do
vírus Chikungunya (CHIKV)**

André Filipe Marques Velez

*DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA
TROPICAL E INTERNACIONAL*

JANEIRO, 2012



**UNIVERSIDADE NOVA DE
LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**



**Produção de *Virus Like Particles* (VLPs) do
vírus Chikungunya (CHIKV)**

André Filipe Marques Velez

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas Especialidade em Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional, realizada sob a orientação
científica de Prof.ª Doutora Aida Esteves Simões*

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia do Ministério da
Educação e Ciência, através de fundos da Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas

JANEIRO, 2012

Agradecimentos

Para a concretização deste projecto foi fundamental a contribuição de diferentes pessoas, de diferentes modos, oferecendo-me apoio a nível académico e na execução da tese, e também a nível pessoal, a quem devo os meus profundos agradecimentos.

Em primeiríssimo lugar gostaria de oferecer a minha eterna gratidão à Professora Doutora Aida Esteves por ter aceite partilhar comigo algum do seu imenso e precioso conhecimento, pela ajuda incansável e pela enorme dose de paciência. Sem a sua orientação, esta tese não teria chegado a bom porto.

Um especial agradecimento também à Dona Fernanda e à Dona Teresa pela boa disposição e contribuição inigualável no auxílio do dia-a-dia no laboratório, bem como aos Professores Ricardo Parreira, João Piedade, pela ajuda e recursos disponibilizados.

Gostaria também de agradecer ao Doutor António Alves de Matos pelo processamento e obtenção das imagens de Microscopia Electrónica, tal como à Doutora Luísa Vieira e colaboradores pela disponibilização do Microscópio de Fluorescência, tornando possível a aquisição dos dados de Imunofluorescência, ambos essenciais para esta tese.

Um enorme abraço a todas as colegas do laboratório, à minha parceira de aventura Tatiana Pinto, à Sandra Marques, à Sandra Castro, à Vera Benavente e à Carina Sousa, pelos bastante apreciados momentos de descontração, partilha de ideias e cumplicidade.

Aos meus amigos de todos os momentos, importantíssimos durante esta minha viagem de dois anos, queria deixar o meu grande obrigado. À Catarina Farinha e à Andreia Matos pela amizade e apoio incondicional e um especial agradecimento sentido ao Thomas Diersche, pela ajuda, os sacrifícios e a paciência infindável que mais ninguém me poderia oferecer.

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação

- Comunicação em Paineis (*Poster*)

Velez, A., Alves de Matos, AP., Parreira, R., Piedade, J., Matos, B., Correia, C., Esteves, A. *Chikungunya virus-like particles*. “Microscopy at the frontiers of science” 2nd joint Congress of the Portuguese and the Spanish Microscopy Societies, 18-21 October 2011, Aveiro, Portugal.

Resumo

Produção de *Virus Like Particles* (VLPs) do vírus Chikungunya (CHIKV)

A. Velez

Palavras chave: *Virus-like particles*, vírus chikungunya, pLEXm, transfecção com polietilenimina, poliproteína estrutural recombinante de CHIKV, células HEK 293T.

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus, transmitido por mosquitos, que causa infecção aguda no Homem caracterizada por febre, mialgia e poliartrite dolorosa e incapacitante que pode durar meses ou anos. Descrito pela primeira vez na Tanzânia em 1952, tornou-se endêmico em África, Índia e sudeste Asiático. Desde 2005, os surtos no oceano Índico e no continente Asiático têm atingido proporções e virulência atípicas, com muitos milhares de indivíduos infectados e mortalidade associada. A mobilidade de indivíduos infectados e a alteração dos padrões de distribuição e abundância dos vectores devido a alterações climáticas, tornaram o CHIKV uma ameaça global sem estratégias de controlo eficazes. Uma abordagem para o controlo da transmissão será o desenvolvimento de uma vacina eficaz. As *virus-like particles* (VLPs) são uma classe segura e eficaz de vacinas que simulam a estrutura nativa das partículas virais. Neste trabalho pretendemos obter um vector de expressão recombinante, capaz de induzir a síntese de VLPs de CHIKV quando transfectado em culturas celulares, como fonte da sequência codificante da poliproteína estrutural para clonagem em baculovírus e produção de VLPs em células de insecto. A ORF estrutural de CHIKV foi amplificada por RT-PCR como um fragmento SacI-NotI e clonada no vector de expressão pLEXm a jusante do promotor forte da beta actina de galinha. Obtiveram-se vários clones com o tamanho correcto do inserto, os quais foram usados para transfectar células HEK 293T usando polietilenimina como agente de fusão. A análise por imunofluorescência indirecta (IF) e *Western blotting* (WB) de células transfectadas, usando um soro policlonal anti-CHIKV, demonstrou que cinco vectores recombinantes expressavam antígenos virais. Um clone apresentou níveis elevados de fluorescência apenas quando da permeabilização celular e induz, muito provavelmente, a síntese de uma glicoproteína E2 truncada (26 kDa) que não é transportada até à membrana citoplasmática. Três clones deram origem a intensidades de fluorescência relativamente fracas que poderão estar correlacionadas com menor taxa de tradução e/ou processamento incompleto. As células transfectadas com pLCHIKS67 revelaram fluorescência e padrão proteico em WB semelhante aos de células infectadas com CHIKV. Ainda, o seu sobrenadante de cultura quando precipitado com PEG 8000 revelou (WB) uma composição de antígenos virais idêntica ao precipitado correspondente de células infectadas com CHIKV. A análise por microscopia electrónica de transmissão de células infectadas com CHIKV e de células transfectadas com pLCHIKS67 demonstrou a presença de VLPs nestas últimas, com dimensões e morfologia idênticas às partículas virais, e ainda um extenso rearranjo de membranas intracelulares, observado igualmente nas células infectadas, o qual deverá estar associado à tradução, processamento e transporte das proteínas estruturais. De acordo com os resultados obtidos, pLCHIKS67 será uma boa fonte da sequência nucleotídica da poliproteína estrutural para usar na geração de baculovírus produtores de VLPs de CHIKV.

Abstract

Chikungunya vírus (CHIKV) *Virus Like Particles* (VLPs) production

A. Velez

Keywords: *Virus-like particles*, Chikungunya virus, pLEXm, recombinant Chikungunya structural protein expression, polyethyleneimine transfection, HEK 293T cells.

Chikungunya vírus (CHIKV) is a mosquito-transmitted alphavirus that causes an acute infection in humans, characterized by fever, myalgia and painful invalidating poly-arthralgia that may last for months. CHIKV was first reported in Tanzania in 1952 and became endemic in Africa, India and South-East Asia. Since 2005, outbreaks in the Indian Ocean and Asian continent reached an atypical magnitude and virulence, with many thousands of people infected and associated fatalities. Travelling and changing patterns of vector distribution and abundance due to climatic changes, make CHIKV a global threat without effective control strategies. One approach to reduce the CHIKV burden is the development of a vaccine. Virus-like particles are a safe and highly effective class of recombinant vaccines that mimic the overall structure of virus particles. Accordingly, we aimed to obtain a recombinant vector, able to induce CHIKV VLPs upon cell transfection, as a source of CHIKV structural genes to construct a recombinant baculovirus for VLP production in insect cells. CHIKV structural ORF was amplified by RT-PCR as a SacI-NotI fragment, and cloned into the mammalian expression vector pLEXm downstream from the strong chick beta actin promoter. Several clones with the correct insert size were obtained and transfected into HEK 293T cells using polyethylenimine as the transfection reagent. Five recombinant vectors were shown to express CHIKV proteins by immunofluorescence (IF) and Western blotting (WB) with a polyclonal serum against CHIKV. One clone, with high levels of IF labelling, demonstrated a truncated viral polyprotein of 26 kDa on WB while three others, with a lower IF signal, originated low levels of viral envelope glycoproteins correctly processed. Cells transfected with clone pLCHIKS67 showed IF staining and viral glycoprotein WB pattern similar with those of cells infected with CHIKV. Precipitation with PEG 8000 of clarified cell culture medium from pLCHIKS67 transfected cells and from CHIKV infected cells generated pellets with an identical content of viral glycoproteins on WB, strongly indicating that pLCHIKS67 transfected cells express CHIKV structural proteins that are assembled into VLPs. Transmission electron microscopy of transfected cells demonstrated cytoplasmic membrane rearrangements similar to the vesicle arrays observed in CHIKV infected cells and confirmed the assembly of VLPs with size and morphology similar to the virus particles produced in infected cells. Therefore, pLCHIKS67 will be used as a source of CHIKV structural genes for construction of recombinant baculoviruses and VLP production in insect cells, well-known for allowing high yields of recombinant protein expression.

Índice

Agradecimentos	I
Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice	V
Lista de abreviaturas	VIII
1. Introdução	1
1.1 O vírus	2
1.1.1 Estrutura do virão	2
1.1.2 Organização genómica	3
1.1.2.1 Regiões codificantes	4
1.1.2.2 Regiões não traduzidas	4
1.1.3 Proteínas virais	5
1.1.3.1 Proteínas não estruturais	5
1.1.3.2 Proteínas estruturais	6
1.1.4 Ciclo replicativo	9
1.1.4.1 Entrada na célula hospedeira	10
1.1.4.2 Expressão das proteínas virais e replicação do genoma viral	10
1.1.4.3 Montagem e saída das partículas virais	12
1.2 Epidemiologia	12

1.2.1 Cronologia e distribuição geográfica	12
1.2.2 Ciclo de transmissão	15
1.2.3 Dinâmica epidemiológica	16
1.2.4 Diversidade genética	17
1.3 A Doença	19
1.3.1 Apresentação clínica e diagnóstico laboratorial	19
1.3.2 Tratamento e profilaxia	21
Objectivos	24
2. Material e Métodos	26
2.1 Isolamento de RNA viral	26
2.2 Síntese de cDNA	27
2.3 Amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV por <i>nested-PCR</i>	28
2.4 Extracção de DNA plasmídico	29
2.5 Clonagem da sequência completa codificante da poliproteína estrutural de CHIKV em pLEXm	30
2.5.1 Purificação de DNA	30
2.5.2 Digestões com enzimas de restrição	30
2.5.3 Reacção de ligação	31
2.5.4 Transformação de células competentes	31
2.5.5 Detecção de clones bacterianos recombinantes	32
2.6 Transfecção de células HEK 293T	33
2.7 Infecção de culturas celulares com CHIKV	34

2.8 Precipitação de partículas virais/VLPs com PEG	34
2.9 Análise de proteínas por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	34
2.9.1 Preparação de extractos proteicos	35
2.9.2 SDS-PAGE	35
2.9.3 <i>Western blotting</i>	35
2.10 Detecção de proteínas virais por microscopia de fluorescência	36
2.11 Preparação de amostras para microscopia electrónica	37
3. Resultados	38
3.1 Amplificação do gene da poliproteína estrutural de CHIKV por <i>nested-PCR</i>	38
3.2 Obtenção de vectores de expressão recombinantes	39
3.3 Expressão de proteínas virais: análise por microscopia de fluorescência	40
3.4 Expressão de proteínas virais: análise por <i>Western blotting</i>	44
3.5 Produção de VLPs de CHIKV	46
4. Discussão	49
Bibliografia	56
Índice de Tabelas e Figuras	70

Lista de Abreviaturas

A, C, G, T	bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina, timina)
aa	aminoácido, do inglês
<i>Ae.</i>	gênero <i>Aedes</i>
ATP	5'-trifosfato de adenosina, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
BEV	vector de expressão de baculovírus
BSA	albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumine</i>
BSL	laboratório de segurança biológica, do inglês <i>BioSafety Laboratory</i>
CPV	vacúolos citopáticos
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CHIKF	febre de Chikungunya
CHIKV	vírus Chikungunya
CSE	elemento de sequência conservado, do inglês <i>conserved sequence element</i>
C-terminal	terminação peptídica com grupo carboxílo livre
Da	Dalton
dNTPs	desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dS/dN	razão entre o número de substituições nucleotídicas sinónimas e não sinónimas
DTT	ditiotreitól
ECSA	genótipo do Este/Centro/Sul Africano, do inglês <i>East/Central/South African</i>
EDTA	etilenodiaminotetracetato

<i>e.g.</i>	por exemplo, da locução latina <i>exempli gratia</i>
<i>et al.</i>	da locução latina <i>et alli</i> , indicando na citação bibliográfica que a obra a que se faz referência tem mais que um autor, mencionando-se apenas o primeiro
EUA	Estados Unidos da América
Fab	região do anticorpo de ligação ao antígeno, do inglês <i>Fragment antigen-binding</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
g	unidade de campo gravitacional, utilizada como unidade de força centrífuga relativa
g/cm ³	unidade de densidade, grama por centímetro cúbico
GTP	5'-trifosfato de guanosina, do inglês <i>guanosine triphosphate</i>
HEK 293T	linha contínua de rim embrionário humano, do inglês <i>human embryonic kidney</i>
IC	células de insecto
<i>i.e.</i>	isto é, da locução latina <i>id est</i>
IF	Imunofluorescência
Ig	Imunoglobulina
kDa	quilo(Daltons) = 10 ³ Daltons
k(p)b	quilo(pares de)bases = 10 ³ (pares de) bases
LB	meio de Luria-Bertani
M	molaridade (mole/litro)
mA	miliampere = 10 ⁻³ Ampere, unidade de intensidade de corrente
MAC-ELISA	do inglês <i>immunoglobulin M antibody (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ME	microscopia electrónica
<i>moi</i>	multiplicidade de infecção, do inglês <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
nt(s)	nucleótido(s)

N-terminal	terminação peptídica com grupo amina livre
NTR	região não traduzida, do inglês <i>non translated region</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	grelha de leitura aberta, do inglês <i>open reading frame</i>
PBS	solução salina tamponada de fosfatos de sódio, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	polietilenimina
PEG	polietilenoglicol
pH	simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica de uma solução
pK	logatítmo da constante de dissociação ácida
proteína C	proteína viral da cápside
p/v	peso por volume
RdRd	polimerase de RNA dependente de RNA
Resíduo C	resíduo cisteína
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	ribonuclease
rpm	revoluções por minuto
RSE	elemento repetitivo de sequência, do inglês <i>repeated sequence element</i>
RT	reação de transcrição reversa
RT-PCR	reação transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	géis de SDS-poliacrilamida
SFV	vírus Semliki Forest

T	número de triangulação
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TBST	solução salina tamponada de Tris, com Tween 20
TE	tampão Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSS	solução de armazenamento e transformação, do inglês <i>Transformation and Storage Solution</i>
U	unidade de actividade enzimática
V	Volt, unidade de tensão eléctrica
VLP	partículas semelhantes a vírus, do inglês <i>virus-like particles</i>
Waf	genótipo do Leste Africano, do inglês <i>West African</i>
WB	<i>Western blotting</i>
°C	grau Celsius

1.

Introdução

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um pequeno vírus de RNA, transmitido por artrópodes (arbovírus), pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. Isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1952, a origem do seu nome deve-se à palavra *Makonde* utilizada para caracterizar a postura curvada dos indivíduos infectados. A partir de 2000, a re-emergência da febre de Chikungunya (CHIKF) em África, no sul e sudoeste Asiático e nas ilhas do oceano Índico conduziu a uma atenção renovada para este vírus. Considerando, *inter alia*, os milhões de pessoas infectadas, a morbidade grave e, desde 2005, alguma mortalidade associada, e ainda a crescente expansão geográfica dos mosquitos vectores, o CHIKV representa uma ameaça real à saúde pública mundial.

1.1 O vírus

Os alfavírus compreendem cerca de 30 espécies de vírus com invólucro, agrupados em 7 serocomplexos de acordo com as suas propriedades antigénicas (Calisher *et al.*, 1988). O CHIKV pertence ao complexo antigénico do vírus Semliki Forest em que também estão incluídos outros alfavírus transmitidos por mosquitos tais como os vírus O'nyong-nyong, Ross River, Mayaro e Semliki Forest.

1.1.1 Estrutura e composição do virião

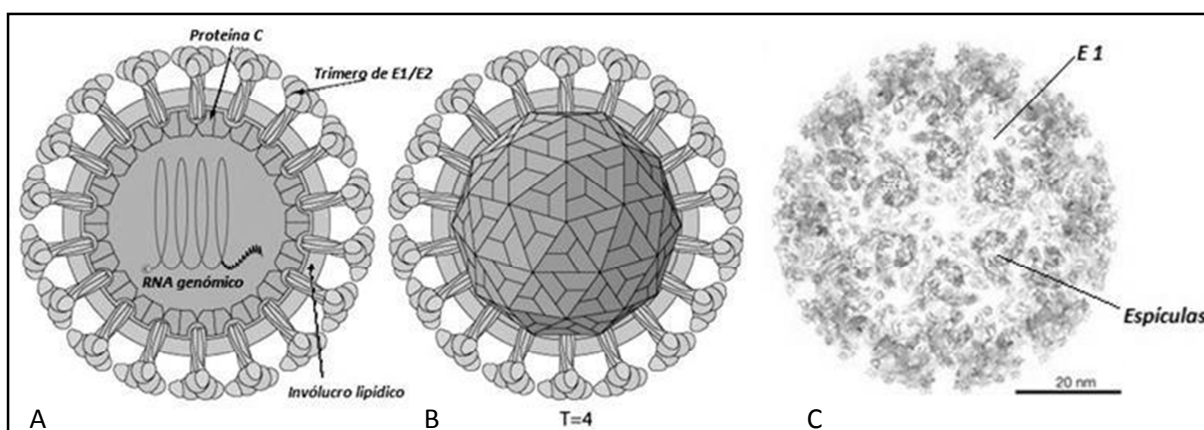


Figura 1.1 Representação esquemática do virião de CHIKV. (A) Corte transversal mostrando, do interior para o exterior: nucleocápside composta pela proteína C com RNA genómico, no seu interior, invólucro lipídico e espículas de glicoproteínas transmembranares E1 e E2 ligadas às proteínas da nucleocápside (B). Simetria icosaédrica da nucleocápside T = 4 (C). B e C adaptados de viralzone.expasy.org. (C) Aspecto tridimensional do virião com espículas de trímeros de E1 e E2, adaptado de Voss *et al.*, 2010.

Por técnicas de cristalografia de raios-x e criomicroscopia electrónica, foi determinada a estrutura do virião dos alfavírus (Figura 1.1) como sendo uma partícula esférica com simetria icosaédrica ($T = 4$), revestida por uma membrana lipídica contendo glicoproteínas virais (Khan *et al.*, 2002). Estas partículas com dimensões de 60-70nm (Higashi *et al.*, 1967; Simizu *et al.*, 1984; Powers *et al.*, 2001), apresentam uma massa molecular de cerca de $5,2 \times 10^6$ Da e densidade de $1,22\text{g/cm}^3$ (Cheng *et al.*, 1995). O genoma viral, consistindo numa única molécula de RNA de cadeia simples, está protegido pela proteína da cápside (C) constituindo uma nucleocápside icosaédrica ($T = 4$) de aproximadamente 40 nm de diâmetro (Jose *et al.*, 2009; Strauss e Strauss, 1994). O invólucro lipídico, rico em esfingolípidos e colesterol, é adquirido a partir da membrana citoplasmática quando da saída dos viriões da célula hospedeira infectada, nos vertebrados, possuindo inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2 e a proteína 6K (Kielian *et al.*, 2000). E1 e E2 existem em grande número no invólucro

viral (240 cópias cada), associando-se na razão de 1:1 em heterodímeros, que por sua vez se associam em 80 espículas constituídas por trímeros destes heterodímeros. E2 é uma proteína transmembranar que, para além de reconhecer os receptores celulares, interage através do seu extremo carboxilo com as proteínas da nucleocápside durante a montagem das novas partículas virais.

1.1.2 Organização genómica

O genoma do CHIKV consiste numa molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva, com cerca de 11,8 kb de comprimento (Strauss e Strauss, 1994). Possui uma estrutura *cap* no extremo 5' e uma cauda poli(A) 3', assemelhando-se a um mRNA eucariótico (Solignat *et al.*, 2009). A sua organização genómica (Figura 1.2) pode ser representada esquematicamente por: 5'-cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(região de junção)-C-E3-E2-6k-E1-poli(A)-3' (Khan *et al.*, 2002).

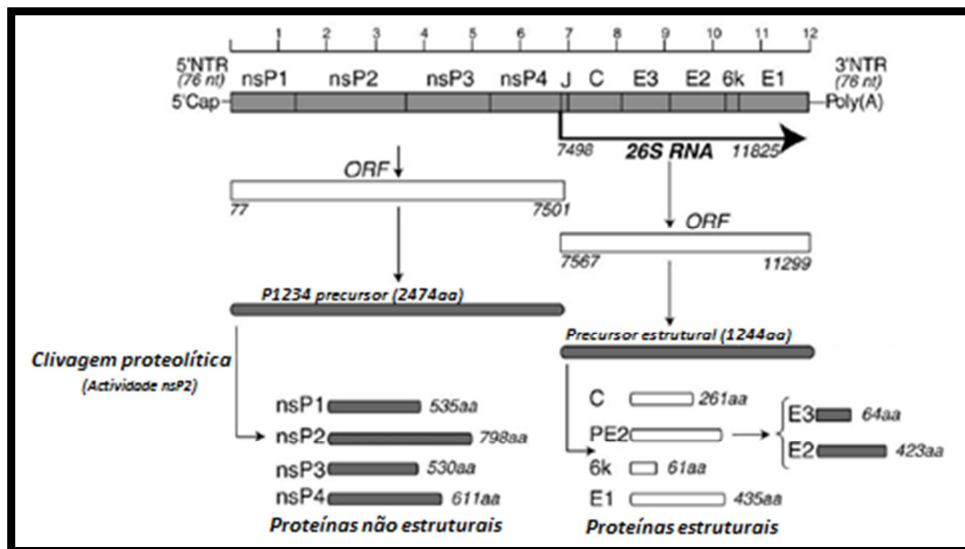


Figura 1.2 Organização do genoma, genes e produtos de expressão de CHIKV. O genoma de CHIKV assemelha-se a um mRNA eucariótico dotado de 5'cap e cauda poli-A. Este possui duas ORFs, uma maior a 5' correspondente às proteínas não estruturais e outra, mais pequena a 3', correspondente às proteínas estruturais. Ambas dão origem a precursores poliproteicos após clivagem proteolítica por proteases virais e/ou celulares. Adaptado de Solignat *et al.*, 2009.

1.1.2.1 Regiões codificantes

O genoma do CHIKV possui 2 grelhas de leitura abertas (ORFs). A ORF 5' (7425 resíduos nucleotídicos, estirpe S27) codifica uma poliproteína ou precursor proteico (2474 resíduos de aminoácidos) designado P1234 que é traduzida a partir de RNA genômico. Este precursor, processado por autoproteólise através do domínio de protease nsP2, dá origem às proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A ORF 3' (3735 resíduos nucleotídicos, estirpe S27), codifica uma poliproteína de 1244 resíduos de aminoácidos que sofre processamento proteolítico e origina as proteínas estruturais C, E1, E2, E3 e 6K (Khan *et al.*, 2002). As duas ORFs estão separadas por uma região de junção (J) não traduzida de 68 nt, altamente conservada entre os alfavírus (*conserved sequence element*, CSE), a qual contém o promotor para a transcrição do RNA subgenômico 26S de polaridade positiva, cuja tradução dá origem às estruturais.

1.1.2.2 Regiões não traduzidas

Para além da região de junção, o genoma do CHIKV possui nos seus extremos mais duas regiões não traduzidas, respectivamente 5'NTR e 3'NTR. A 5'NTR possui 76 resíduos nucleotídicos e forma duas estruturas tipo *stem-loop* (Khan *et al.*, 2002). Esta estrutura secundária, contrariamente à sequência nucleotídica, está conservada nos alfavírus e tem um papel essencial como promotores para a síntese de RNA viral genômico e antígenômico (Frolov *et al.*, 2001). Na região 3'NTR observa-se uma maior heterogeneidade entre diferentes alfavírus em termos de sequência e de tamanho (Pfeffer *et al.*, 1998), apresentando um comprimento relativamente elevado no CHIKV (cerca de 500 nt) comparativamente com outros alfavírus (Khan *et al.*, 2002; Pfeffer *et al.*, 1998). A diversidade da 3'NTR deve-se essencialmente ao tipo e número variável de elementos de sequências repetidas (*repeated sequence elements*, RSEs), sendo 3 completas e duas truncadas no caso do CHIKV. Apesar desta diversidade, existe um CSE de 19 nt imediatamente adjacente à cauda poli(A) comum aos alfavírus e de importância controversa para a replicação viral (Solignat *et al.*, 2009).

1.1.3 Proteínas virais

1.1.3.1 Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais do CHIKV são sintetizadas directamente a partir do RNA genómico viral 49S como uma poliproteína precursora (P1234). Esta é progressivamente processada em proteínas individuais pela actividade proteolítica associada ao domínio protease cisteínica de nsP2.

nsP1 possui 535 aa e noutros alfavírus foi demonstrada a actividade de metilase de GTP, devendo funcionar como enzima de *capping* dos RNAs virais de polaridade positiva (Mi *et al.*, 1989). nsP1 possui uma hélice anfipática e um conjunto de aminoácidos básicos responsáveis pela associação a membranas celulares. Esta característica é única entre as proteínas não estruturais funcionando na ancoragem dos complexos de replicação às membranas celulares (Wang *et al.*, 1991). Juntamente com nsP4, está envolvida na síntese de RNA antigenómico (Solignat *et al.*, 2009).

nsP2 de CHIKV é a maior proteína não estrutural (798 aa, estirpe S27) e possui carga global positiva (+21) (Khan *et al.*, 2002). Na região N-terminal existe um domínio de helicase (Gorbalenya e Koonin, 1988) e motivos de ligação a trifosfatos de nucleósido (GVPGSGKS e DEA) típicos da actividade de trifosfatase de nucleósidos dos alfavírus (Solignat *et al.*, 2009). ATP e GTP são substratos da trifosfatase cuja actuação deverá contribuir para a actividade de helicase e para a actividade de *capping* de nsP1, respectivamente. A região C-terminal de nsP2 possui um motivo CWA (470-480) de protease cisteínica e um domínio metiltransferase não funcional que poderá estar implicado na regulação da actividade de protease (Gould *et al.*, 2010). Esta actividade pode ser exercida em *cis* e em *trans*, devido à diferente preferência de substrato por parte das várias formas de nsP2. Nas fases iniciais da infecção, a nsP2 presente na poliproteína P1234 consegue hidrolisar apenas a junção nsP3/nsP4 em *cis* originando P123 e nsP4. Os restantes locais de hidrólise dentro de P123 só são cortados em *trans*. À medida que a infecção progride, a concentração de P123 aumenta podendo hidrolisar em *trans* outras moléculas de P123 ou de P1234 na junção nsP1/nsP2 originando P23 ou P234 e nsP1, respectivamente. Só então, uma molécula de poliproteína P23 ou P234 em *trans* consegue clivar a ligação nsP2/nsP3 individualizando finalmente todas as unidades da poliproteína P1234 (Jose *et al.*, 2009). Por explicar permanece o significado dos sinais de localização nuclear identificados nesta proteína, bem como a detecção de 50% da quantidade total de nsP2 celular no núcleo (Perenen *et al.*, 1990).

A nsP3 do CHIKV é uma fosfoproteína de 530 aa, com forte carga negativa comparativamente com a de outros alfavírus (Khan *et al.*, 2002). Possui dois domínios distintos, o domínio N-terminal (160 aa) é conservado e apresenta homologia com o domínio “macro” da histona H2A (Pehrson *et al.*, 1998). Este domínio da nsP3 de CHIKV possui actividades de ligação a ADP-ribose e de fosfatase de di-fosforribose 1”-fosfato (Malet *et al.*, 2009). Desconhece-se a função do domínio macro de CHIKV, no entanto a sua capacidade de ligação a RNA de nsP3 poderá ajudar ao recrutamento de RNA pelas proteínas do complexo replicativo, enquanto a actividade de fosfatase poderá estar relacionada com a indução de apoptose nas células infectadas (Jose *et al.*, 2009). O domínio C-terminal, variável em sequência e comprimento nos alfavírus, é fortemente fosforilado em resíduos serina e treonina, modificação que, no vírus Sindbis e Semliki Forest, é essencial para a transcrição eficiente de RNA de polaridade negativa (Dé *et al.*, 2003; Vihinen *et al.*, 2001) e virulência em murinhos para este último (Galbraith *et al.*, 2006).

Nos alfavírus nsP4 tem actividade de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp). A RdRp de CHIKV possui 611 aa, com o motivo GDD canónico das polimerases dependentes de RNA perto do extremo carboxilo (Khan *et al.*, 2002). nsP4 possui igualmente actividade de adeniltransferase terminal, podendo ser responsável pela manutenção da cauda poli(A) do RNA genómico viral (Tomar *et al.*, 2006). Em CHIKV, a síntese de nsP4 pode decorrer de um mecanismo de *readthrough* de um codão opal no final de nsP3 conforme identificado nos isolados do oceano Índico e comum à maioria dos alfavírus (Shuffenecker, 2006) ou ainda na continuação da tradução da restante poliproteína quando aquele codão de terminação não está presente, como é o caso da estirpe S27 (Khan *et al.*, 2002). Porém, mesmo nesta situação, a concentração celular de nsP4 é predominantemente mais baixa do que as outras proteínas não estruturais devido à existência de um resíduo de tirosina N-terminal conservado que dita uma rápida degradação de nsP4 (de Groot *et al.*, 1991).

1.1.3.2 Proteínas estruturais

A tradução do mRNA subgenómico 26S dos alfavírus origina uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares, durante e após a tradução, para dar origem às várias proteínas estruturais individuais.

A proteína da cápside (C) do CHIKV é constituída por 261 aa e tem uma massa molecular aparente de 30 kDa. A função da região N-terminal é desconhecida e pouco conservada entre os alfavírus, à excepção duma pequena região com o motivo de hélice alfa tipo fecho de leucinas (43-KAGQLAQLISAVNKLTM-60) considerada como tendo um papel importante na montagem da nucleocápside (Perera *et al.*, 2003). Ainda na região N-terminal, sobreponível com um domínio de ligação a RNA, existe um domínio de ligação à subunidade grande dos ribossomas (aa 98-112) (Perera *et al.*, 2001) que poderá ter um papel activo na desmontagem da nucleocápside (Singh e Helenius, 1992). A região C-terminal apresenta um domínio de protease serínica, homólogo de outros alfavírus e para os quais foi demonstrada actividade autoproteolítica *in cis* responsável pela separação da proteína C do restante polipéptido nascente (Strauss *et al.*, 1990). Sobreponível com o domínio de protease encontra-se um bolso hidrofóbico de ligação à proteína do invólucro E2, importante para a aquisição do invólucro viral (Skoging *et al.*, 1996).

A proteína E1 do invólucro viral de CHIKV contém 435 aminoácidos e uma massa molecular aparente de 44 kDa. Possui um motivo potencial de glicosilação (resíduos 141-143 de E1) (Khan *et al.*, 2002). O resíduo C-433 que no vírus Semliki Forest é palmitoilado, também está conservado em CHIKV (Solignat *et al.*, 2009). E1 é constituída por um ectodomínio com três domínios em β -barrel (I, II e III) e uma hélice transmembranar no extremo carboxílico. Os seis resíduos do extremo carboxílico projectam-se para o interior da partícula viral. O domínio II é responsável pela interacção com E2 na formação de heterodímeros (Voss *et al.*, 2010). E1 tem como principal função a fusão do invólucro viral com a membrana dos endossomas celulares quando da entrada do vírus na célula, na qual tem um papel activo a ansa de fusão hidrofóbica interna situada no topo do domínio II (resíduos 83-98 de E1) (Voss *et al.*, 2010).

A proteína E2 do CHIKV é composta por 423 aminoácidos, correspondendo a uma massa molecular aparente de 43 kDa, e possui dois motivos potenciais de glicosilação (resíduos 263-265 e 345-347 de E2) (Khan *et al.*, 2002). No extremo carboxilo de E2 existem ainda três resíduos de cisteína e dois resíduos de tirosina potenciais alvos de palmitoilação e fosforilação, respectivamente (Solignat *et al.*, 2009). E2 é uma proteína alongada do tipo imunoglobulina onde foram identificados 3 domínios conformacionais, domínio A – porção N-terminal responsável pela interacção com os receptores celulares, domínio B – porção média e responsável pelo reconhecimento celular e domínio C – engloba a hélice transmembranar e um segmento de 33 resíduos C terminais citoplasmáticos de interacção com

a proteína da cápside. Nos domínios A e B estão expostos vários locais de ligação a anticorpos neutralizantes, bem como vários locais de reconhecimento celular, fazendo desta a glicoproteína mais imunogénica (Kielian, 2010). Dados de cristalografia demonstraram que E2 oculta grande parte de E1, com a ansa de fusão de E1 alojada entre os domínios A e B de E2, protegendo-a assim de uma exposição precoce (Kielian, 2010). A presença de histidinas, argininas e lisinas nesta região de E2 sugere que ocorra uma destabilização das pontes de hidrogénio como resposta à acidificação do pH abaixo do pK das histidinas, levando à exposição da ansa de fusão de E1 (Li *et al.*, 2010). As mutações nos domínios A e B da proteína E2 afectam o tropismo celular, nomeadamente a gama de hospedeiros, e a infecciosidade de CHIKV nas células do intestino médio do vector artrópode (Kielian, 2010).

A proteína E3 do CHIKV é constituída por 64 aminoácidos (Khan *et al.*, 2002) e é um dos produtos da proteólise do precursor de E2 (pE2) pela furina no *trans*-Golgi. Esta proteína em CHIKV não está associada ao virião, mas é secretada pelas células infectadas (Simizu *et al.*, 1984). A função de E3 do CHIKV ainda não foi estudada, no entanto pensa-se que partilhe a actividade de isomerase de dissulfito descrita para o vírus Sindbis (Parrot *et al.*, 2009) podendo funcionar como chaperone para aquisição da conformação correcta e formação de ligações dissulfito nas glicoproteínas E1 e E2 (Solignat *et al.*, 2009). Esta poderá ainda servir de estabilizador da conformação do heterodímero pE2/E1, nomeadamente da proteína de fusão E1, quando do transporte através do ambiente moderadamente ácido do Golgi (Li *et al.*, 2010; Voss *et al.*, 2010). Estudos realizados com os vírus Sindbis e Semliki Forest demonstraram que a clivagem de E3 é essencial para a infecciosidade das novas partículas virais e que os vírus contendo heterodímeros de pE2/E1, são mais resistentes ao pH ácido pelo que o processamento de pE2 é importante para a actividade de fusão de E1 (Salminen *et al.*, 1992; Smit *et al.*, 2001).

A proteína 6K é uma pequena proteína estrutural com apenas 61 aminoácidos (6 kDa), rica em cisteínas e palmitoilada (Khan *et al.*, 2002). Esta proteína é incorporada em baixas quantidades nos virões de CHIKV (7 a 30 cópias), apesar de ser traduzida equimolarmente com as restantes proteínas estruturais (Gaedigk-Nitschko *et al.*, 1990; Lusa *et al.*, 1991). Desconhece-se a sua localização exacta nas partículas virais maduras. A sua deleção resulta numa redução substancial da produção de vírus e/ou produção de vírus com morfologia aberrante (Liljestrom *et al.*, 1991). Tem sido sugerido que esta proteína possa também ter a função de formar canais de iões de origem viral (viroporina) facilitando a gemulação e saída dos vírus da célula hospedeira (Melton *et al.*, 2002).

1.1.4 Ciclo replicativo

Actualmente, uma quantidade substancial de dados referentes ao ciclo replicativo de CHIKV (Figura 1.3) continua a ser adquirida por inferências de dados conhecidos para outros alfavírus e por comparações de sequências de aminoácidos de proteínas virais de outros alfavírus. Resumidamente, após entrada na célula hospedeira por endocitose, o genoma viral é libertado no citoplasma, traduzidas as proteínas não estruturais e iniciada a síntese de RNA viral associada a membranas celulares. As proteínas estruturais traduzidas em associação com o retículo endoplasmático, migram para a membrana celular onde as novas partículas são formadas e libertadas adquirindo concomitantemente um invólucro de origem celular.

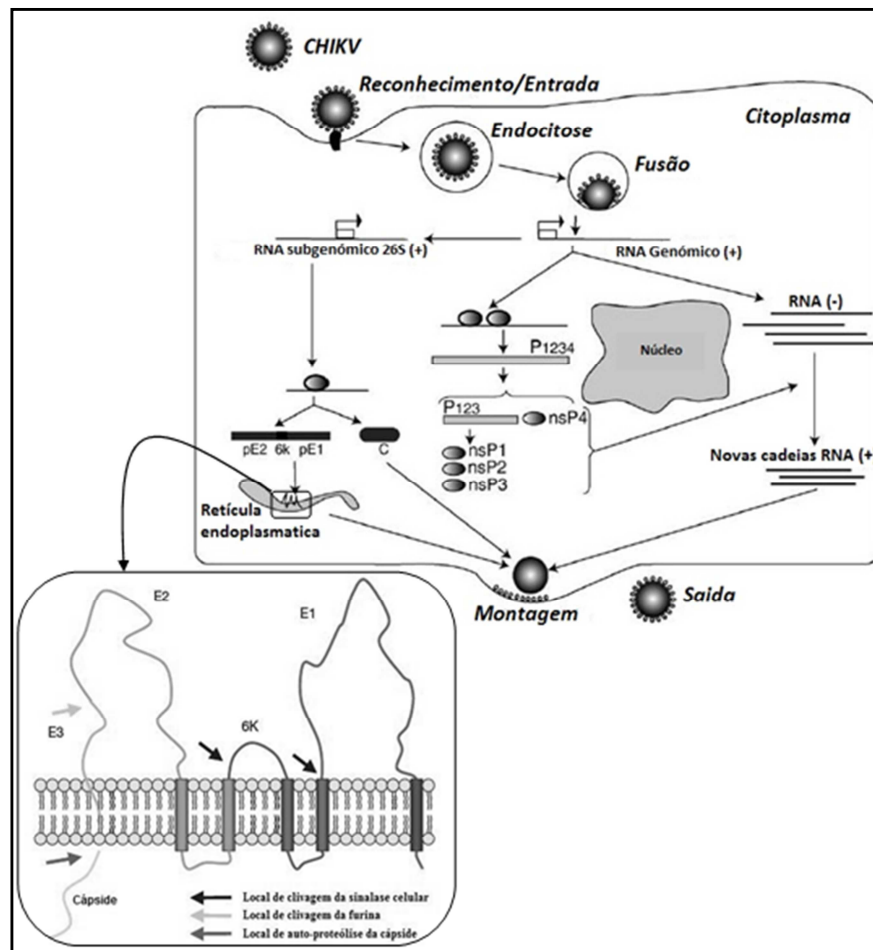


Figura 1.3 A. Ciclo replicativo de CHIKV. Após ligação à célula hospedeira, o vírus é endocitado. Após fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, o genoma viral é libertado no citoplasma, e traduzido para dar origem às proteínas não estruturais (nsP1-4). Estas iniciam a replicação do genoma viral através da síntese de um RNA antígeno e, a partir deste, a transcrição do RNA subgenómico 26S. A tradução do RNA 26S dá origem à poliproteína estrutural C-pE2-6K-E1 que é processada em proteínas individuais. Após autoproteólise da cápside, as glicoproteínas sintetizadas em associação com a via secretória migram para a membrana celular, onde a associação com proteínas da cápside e genoma viral (nucleocápsides) induz a gemulação e libertação de partículas virais com invólucro. Adaptado de Solignat *et al.*, 2009. **B.** Esquema da poliproteína estrutural e sua inserção na membrana do retículo endoplasmático mostrando a posição das proteínas da cápside, E3, E2, 6k e E1. Adaptado de Li *et al.*, 2010.

1.1.4.1 Entrada na célula hospedeira

Na natureza e como parte do seu ciclo de transmissão, o CHIKV infecta essencialmente mosquitos do género *Aedes* e primatas. Estudos para determinação do tropismo celular do CHIKV revelaram uma extensa gama de células humanas susceptíveis incluindo linhas celulares aderentes, endoteliais e epiteliais, fibroblastos e macrófagos primários. Pelo contrário, o vírus não infecta produtivamente linfócitos B e T ou células dendríticas derivadas de monócitos (Sourisseau *et al.*, 2007; Solignat *et al.*, 2009). Nos indivíduos infectados foi detectada replicação viral nas células satélite do tecido muscular (Ozden *et al.*, 2007) e, em primatas não humanos, os macrófagos foram identificados como o reservatório de infecção viral de longa duração (Labadie *et al.*, 2010).

Apesar dos estudos de tropismo realizados, os receptores celulares aos quais se liga a glicoproteína E2 de CHIKV ainda não foram identificados. Porém, o facto de se ter encontrado células susceptíveis, células a que o vírus se liga eficientemente sem entrar e células a que o vírus é incapaz de se ligar poderá contribuir para a identificação dos receptores celulares do CHIKV. Para entrar em células humanas susceptíveis, o CHIKV usa preferencialmente uma via de endocitose independente de clatrina e dependente de Eps15 e de colesterol. A integridade do citosqueleto e a acidificação do pH dos endossomas são igualmente necessários à entrada do vírus (Bernard *et al.*, 2010). Para os alfavírus, é genericamente aceite que o pH baixo dos endossomas origine uma reorganização conformacional do heterodímero E1/E2, com formação de trímeros de E1, exposição da sua ansa de fusão e subsequente fusão das membranas celular e viral. Uma vez no citoplasma, ocorre a desintegração da nucleocápside provavelmente com a intervenção dos ribossomas (Singh e Helenius, 1992).

1.1.4.2 Expressão das proteínas virais e replicação do genoma viral

Após descapsidação, o genoma viral é directamente traduzido dando origem à poliproteína P1234, entrando esta num processo de autoproteólise progressiva (descrito em 1.1.3.1) para dar origem às proteínas não estruturais do complexo de transcrição/replicação que medeia a síntese dos diversos RNAs virais de ambas as polaridades. A composição deste complexo e as suas características funcionais variam ao longo da infecção permitindo controlar, quantitativa e temporalmente, a síntese do RNA antigenómico, genómico e

subgenómico. Resumidamente, na primeira fase da replicação a polimerase nsP4 separada por proteólise da poliproteína P123 e combinada com esta, medeia a síntese do RNA de polaridade negativa (antigenómico) em complexos de semi-vida curta. O posterior processamento de P123 origina complexos de replicação tardios estáveis que sintetizam os RNAs de polaridade positiva genómico e subgenómico abundantes (Shirako e Strauss, 1994). Os complexos de replicação são inicialmente ancorados à membrana citoplasmática através de nsP1 e transportados para a superfície em grandes vacúolos endolisossomais, também designados vacúolos citopáticos do tipo I (CPV I) (Kujala *et al.*, 2001; Spuul *et al.*, 2010). A síntese de RNA ocorre nos complexos de replicação presentes em pequenas invaginações da membrana (esférulas) com um poro de ligação ao citoplasma por onde saem os RNAs de polaridade positiva (Spuul *et al.*, 2010).

O mRNA subgenómico 26S dos alfavírus, sintetizado em excesso relativamente ao RNA genómico, é traduzido na poliproteína C-pE2-6K-E1. A proteína da cápside (C) é traduzida em primeiro lugar e libertada da restante poliproteína por autoproteólise (Strauss *et al.*, 1990) para posteriormente encapsidar novas moléculas de RNA genómico. Após a libertação da proteína C, gera-se uma sequência sinal N-terminal na cadeia polipeptídica nascente (pE2-6K-E1) que determina a translocação desta para a membrana do retículo endoplasmático. Aqui, a poliproteína precursora das proteínas do invólucro sofrerá alterações conformacionais, por intermédio de proteínas chaperonas, processamento por sinalases celulares, dando origem a E1, 6K e pE2 individualizadas e ancoradas na membrana do retículo endoplasmático (Metz *et al.*, 2011). No lúmen do retículo, pE2 e E1 sofrem glicosilação e palmitoilação, modificações necessárias para que o transporte até à superfície celular seja completado (Garoff *et al.*, 1990). No *cis*-Golgi, E1 e pE2 formam heterodímeros (Metz *et al.*, 2011). Durante o transporte nas vesículas do *trans*-Golgi, pE2 sofre uma reorientação associada a eventos de fosforilação com passagem do domínio carboxilo terminal de ligação à proteína da cápside para o citoplasma. Antes de chegar à superfície da célula pE2 é ainda processado por uma proteinase do tipo furina, gerando E3 e E2 que permanecem associados a E1 para evitar a exposição precoce da ansa de fusão de E1 (descrito em 1.1.3.1) (De Curtis e Simons, 1988).

1.1.4.3 Montagem e saída das partículas virais

O modelo mais consensual da montagem dos alfavírus propõe a ligação entre a proteína da cápside e o RNA genómico como o evento promotor da formação da nucleocápside, a que se segue a interacção entre a nucleocápside e as glicoproteínas virais na membrana celular que resulta na gemulação e saída do vírus com concomitante aquisição do invólucro (Strauss e Strauss, 1994). Uma vez que não foram encontradas nucleocápsides vazias e a proteína da cápside é monomérica na ausência de ácido nucleico, a interacção entre a proteína da cápside e a sequência de encapsidação do RNA viral, ainda não identificada para o CHIKV, será o evento de nucleação que permitirá a ligação de uma segunda molécula da proteína da cápside e subsequente dimerização destas proteínas (Warrier *et al.*, 2008). As nucleocápsides formadas seguem para a membrana citoplasmática através de uma via ainda desconhecida e aí as proteínas da cápside interagem com o domínio citoplasmático de E2 proporcionando a energia livre necessária à gemulação e aquisição do invólucro (Tzllil *et al.*, 2004).

Foi também proposto um modelo alternativo da montagem dos alfavírus em que as glicoproteínas virais dirigem a organização das proteínas da cápside e genoma viral na membrana citoplasmática, sendo as nucleocápsides observadas no citoplasma por microscopia electrónica produtos *dead-end* (Forsell *et al.*, 1996; Garoff *et al.*, 2004). No entanto, a formação *in vitro* de nucleocápsides do vírus Sindbis a partir de proteína da cápside purificada e de ácido nucleico e obtenção de partículas infecciosas após microinjecção das nucleocápsides pré-montadas, favorece o primeiro modelo descrito (Snyder *et al.*, 2011).

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Cronologia e distribuição geográfica

Antes de ter sido descrita em 1956, existem registos que descrevem febres epidémicas, acompanhadas por artralgias sugestivas de infecções por CHIKV (Mckenzie *et al.*, 2001). Esta apresentação sintomática terá provavelmente sido confundida com epidemias de outros arbovírus como a Dengue, O'nyong-nyong ou Sindbis (Harley *et al.*, 2001). Em 1779, David Bylon em Jacarta, Indonésia, descreveu uma doença febril associada a dores, rigidez e inchaço nas articulações dos tornozelos que o atingiu. Este poderá ter sido o primeiro

testemunho de CHIKF, erradamente atribuído a Dengue. No mesmo ano, o mesmo tipo de doença e sintomas foram observados no Cairo, Egito (Carey, 1971). Quarenta anos passados, em 1820 um surto de maiores dimensões em Zanzibar, Tanzânia, atingiu uma expressão geográfica grande, quando a doença viajou em navios transportadores de escravos para África, Caraíbas e Índia. Apesar de não terem sido registados casos fatais, estima-se que 95% da população de Calcutá, Índia, tenha sido infectada num curto período de 3 meses (Carey, 1971). Mais tarde, em 1853 e 1871, novo surto proveniente de Zanzibar afectou a Índia, Myanmar e Indonésia, tendo James Christie documentado que a doença atingia indiscriminadamente homens e mulheres, crianças e idosos, pobres e ricos.

No século XX, continuaram a ser observados episódios epidémicos com sintomas semelhantes a todos os anteriores, até que em 1952-3, na Tanzânia, o vírus chikungunya (CHIKV) foi finalmente isolado e confirmado como agente causador dos surtos epidémicos (Lumsden, 1955; Robinson, 1955; Ross, 1956). A primeira detecção oficial de CHIKV no continente asiático foi efectuada em Bangkok, Tailândia, em 1958 (Hammon e Sather, 1964).

Outros surtos se seguiram, predominantemente no continente asiático e africano. Na Ásia, na década de 60 foram registadas epidemias na Índia, Sri Lanka, Myanmar, Cambodja, Vietname, Filipinas e Tailândia. Nas décadas de 80 e 90 apenas pequenos surtos foram registados na Tailândia, Filipinas, Indonésia e Malásia (Lam *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 2006). Também no mesmo período em África foram detectados surtos de CHIKV, embora a reduzida monitorização de então tenha ditado o desconhecimento do seu verdadeiro impacto. As principais áreas afectadas localizam-se na África sub-Sariana, nomeadamente na África ocidental (Senegal, Camarões, Benim, Guiné, Costa do Marfim e Nigéria) e África central e do sul (Sudão, Uganda, República Democrática do Congo, Angola, Malawi, República Centro-Africana, Burundi, Zimbabué, Quénia e África do Sul) (Pastorino *et al.*, 2004; Powers e Logue, 2007).

Todavia, entre 2001 e 2007, ocorreram vários surtos que afectaram as ilhas do Oceano Índico, nomeadamente as Maurícias, Mayotte, Madagáscar, mas nenhum deles comparável com o surto de 2004 na ilha da Reunião *Outbreak and spread of Chikungunya* (Anónimo, 2007). O surto na ilha da Reunião foi o mais severo tendo 1/3 da população local sido infectada (cerca de 266000 infectados) (Reiter *et al.*, 2006). O mosquito *Aedes albopictus* esteve envolvido na transmissão da doença durante o surto (Reiter *et al.*, 2006), que teve uma dinâmica de transmissão semelhante à epidemia de 1870, passando do leste do continente

africano para o sul e sudoeste asiático (Ng *et al.*, 2010). O seu impacto no sub-continente Indiano em 2006 revelou-se sem precedentes, tendo atingido cerca de 1,42 milhões de pessoas, alastrando-se posteriormente a epidemia para outros países vizinhos (Townson *et al.*, 2008). O vector responsável envolvido na transmissão foi *Aedes aegypti* (Townson *et al.*, 2008).



Figura 1.4 Distribuição global do vírus Chikungunya em 2007. Este vírus é endémico de países da África central e do sul, e epidémico no subcontinente Indiano e sudoeste Asiático. Com alguns casos importados registados pelo mundo, Itália e França já registaram transmissões autóctones nos seus territórios. Adaptado de Powers e Logue, 2007.

Actualmente, o CHIKV é conhecido como endémico de países de África ocidental, central e do sul, e epidémico no sub-continente Indiano e sudoeste Asiático (Figura 1.4). Contudo, a sua presença foi também já detectada em zonas não endémicas como na Europa e América. Casos importados têm ocorrido esporadicamente aquando do regresso de turistas de zonas infectadas: Índias Ocidentais Francesas e Guiana, Austrália, Alemanha, Suíça, Itália, Noruega, China e Guiana Francesa, Estados Unidos (Pialoux, 2007). A mudança do vector de transmissão da doença de *Ae. aegypti* para *Ae. albopictus* poderá ter contribuído para a maior dispersão de CHIKV devido à sobrevivência do novo vector em climas temperados onde *Ae. aegypti* não subsiste (Metz *et al.*, 2011). Em 2007, um primeiro surto em Itália colocou em sobreaviso os países ocidentais. Partindo de um caso importado da Índia, a doença propagou-se localmente através do mosquito *Ae. albopictus*, tendo sido registado um total de 197 casos (Angelini *et al.*, 2007). Em 2010, em França, *Ae. albopictus* foi também responsável pela transmissão local em 2 casos documentados (Gould *et al.*, 2010).

1.2.2 Ciclo de transmissão

O CHIKV mantém dois ciclos distintos de transmissão: o ciclo silvático e o ciclo urbano. Em África predomina o ciclo silvático, ocorrendo nas zonas rurais do Senegal, Costa do Marfim, República Centro-Africana e África do Sul, onde o vírus é mantido em primatas não humanos e possivelmente roedores, sendo transmitido por espécies de mosquitos do género *Aedes* típicos da floresta (eg. *Ae. furcifer* e *Ae. africanus*) (Diallo *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2001; Jupp *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 2010). O ciclo urbano, em que o Homem é o hospedeiro natural, foi também documentado em localidades do Quênia, Comores e Senegal, sendo a transmissão assegurada por mosquitos domésticos e peridomésticos como *Ae. aegypti* (Figura 1.5B) (Ng *et al.*, 2010). Nos períodos epidémicos, os seres humanos são reservatórios efectivos (McCrae *et al.*, 1971). Os primatas também podem ser alvo de surtos quando a imunidade de grupo é baixa, desenvolvendo virémia na ausência de manifestações físicas da doença (Pialoux *et al.*, 2007). Nos períodos secos, pensa-se que o vírus se mantenha em níveis reduzidos por transmissão transovárica e transmissão horizontal (Bilsel *et al.*, 1988).

Na Ásia, o ciclo urbano é predominante nos países onde o vírus é conhecido (Diallo *et al.*, 1999). Porém, o recente isolamento do vírus de primatas não humanos da selva da Malásia (Apani *et al.*, 2009) e dados de estudos evolutivos, sugerem a ocorrência do ciclo silvático no continente asiático. Curiosamente, os vírus de primatas formavam um grupo geneticamente distinto, sugestivo de evolução dentro da população de primatas, e estavam estreitamente relacionados com vírus de casos humanos isolados no surto de 2006 na Malásia indicando a transmissão entre primatas e humanos à semelhança do que acontece em África. Sendo principalmente urbanas, as epidemias de CHIKV na Ásia seguem uma dinâmica epidemiológica semelhante ao vírus da Dengue, caracterizado pela ausência de um reservatório animal e a capacidade de infectar rapidamente humanos via mosquitos domésticos e peridomésticos (Vanlandingham *et al.*, 2005). O principal vector presente é *Ae. aegypti*, mosquito urbano antropofílico, servindo os humanos de reservatório. Devido à densidade populacional nalguns países asiáticos afectados, as epidemias são em larga escala.

Recentemente a espécie *Ae. albopictus* (Figura 1.5A), têm-se revelado um vector de transmissão de CHIKV muito eficiente (Her *et al.*, 2009). *Ae. albopictus* é um mosquito tanto urbano como rural, zoofílico e antropofílico (Pialoux *et al.*, 2007). Esta espécie encontra-se actualmente distribuída pela Ásia, ilhas do Pacífico, África, Médio Oriente, Europa e América (Enserink, 2008). Sendo originalmente uma espécie silvática, *Ae. albopictus* tem demonstrado

uma elevada capacidade de adaptação aos seres humanos e a ambientes urbanos, competindo actualmente com *Ae. aegypti* em cenários urbanos de países asiáticos e africanos (Knudsen, 1995). *Ae. albopictus* procria tanto em reservas de água naturais como artificiais e alimenta-se numa gama variada de hospedeiros, incluindo animais de sangue frio e de sangue quente (Delatte *et al.*, 2009). A entrada de *Ae. albopictus* no ciclo de transmissão do CHIKV tem-se revelado uma ameaça devido ao facto de este mosquito existir não só em climas quentes, mas também em climas temperados onde *Ae. aegypti* é escasso.

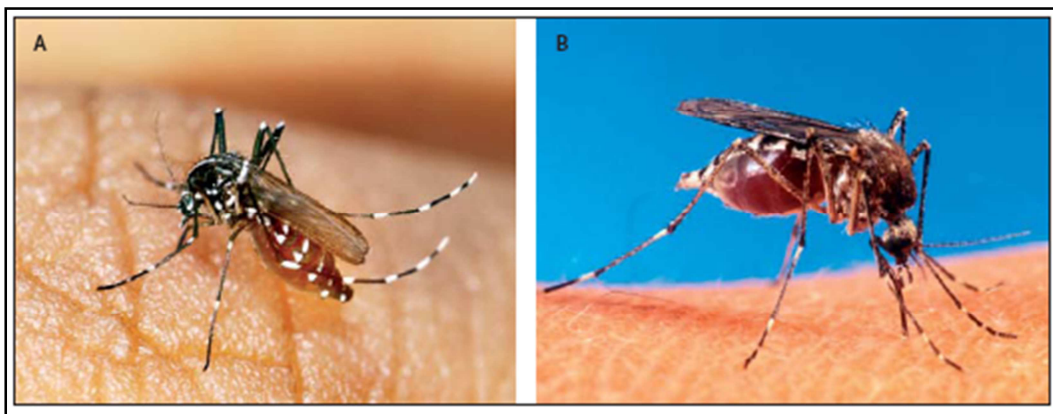


Figura 1.5 (A) O vector *Aedes albopictus* sobrevive em ambientes temperados onde *Aedes aegypti* (B) não consegue sobreviver, tornando-o um veículo de doenças tropicais para os países ocidentais. Adaptado de Pialoux *et al.*, 2007.

1.2.3 Dinâmica epidemiológica

Classicamente, as epidemias de febre de Chikungunya (CHIKF) tendem a manifestar-se em intervalos de 40 a 50 anos (Halstead, 2009). Desconhece-se a gama completa dos factores determinantes dos longos períodos inter-epidémicos, sendo uma das causas prováveis a de este intervalo representar o tempo necessário para que uma população perca a imunidade, tornando-a novamente vulnerável (Ng *et al.*, 2010). Como todas as arboviroses, a frequência dos surtos de CHIKF é ditada pelo começo da época das chuvas, quando a densidade de vector é mais elevada. As dimensões dos surtos regem-se por um equilíbrio entre a imunidade de grupo e a densidade populacional, sendo o seu impacto mais significativo quanto menor for a imunidade de grupo e maior a densidade populacional. As epidemias podem também ser potenciadas por uma variedade de outros factores como a evolução viral, alterações climáticas, controlo vectorial e globalização (comércio e turismo – importação de casos) (Her *et al.*, 2009).

A forma epidemiológica endêmica (associada à transmissão pelo ciclo silvático) ocorre principalmente em zonas rurais do continente Africano, onde estão disponíveis uma grande variedade de vectores e reservatório (Diallo *et al.*, 1999). Devido à sua natureza predominantemente rural e à manutenção da imunidade de grupo, os surtos deste tipo manifestam-se com reduzidas dimensões, contabilizando um número baixo de pessoas afectadas (Lumsden, 1955). Na forma endêmica, a exposição ao CHIKV é detectada ocasionalmente em testes serológicos (Diallo *et al.*, 1999; Strauss e Strauss, 1994).

Ao contrário da forma endêmica, a forma epidémica ocorre principalmente associada a zonas urbanas e semi-urbanas densamente povoadas do continente Asiático, onde CHIKV é transmitido entre populações com baixa imunidade de grupo (Pialoux *et al.*, 2007). Deste modo, os surtos epidémicos revelam-se abruptos e com elevadas taxas de incidência cumulativa. Comparativamente, no surto na Índia em 1978 esta taxa foi de 37%, contudo, na recente epidemia também na Índia, esta atingiu valores tão altos quanto 67% nalgumas regiões (Padbidri *et al.*, 1979; Dwibedi *et al.*, 2008). Posteriormente ao surto inicial, os surtos seguintes tornam-se menos penetrantes, devido ao aumento gradual da proporção de população que desenvolve imunidade (Laras *et al.*, 2005). Este facto foi testemunhado na Ásia e mais recentemente na ilha da Reunião (Mckenzie *et al.*, 2001; Pialoux *et al.*, 2007).

1.2.4 Diversidade genética

As primeiras análises filogenéticas de CHIKV, baseadas em sequências nucleotídicas parciais, identificaram 3 genótipos correspondentes a distribuições geográficas distintas: o genótipo do Leste Africano (WAF), o genótipo do Este/Centro/Sul Africano (ECSA) e o genótipo Asiático (Powers *et al.*, 2000). Estudos posteriores, com genomas completos e envolvendo um grande número de sequências, confirmaram estes genótipos e incluíram as estirpes mais recentes do Oceano Índico no genótipo ECSA (Volk *et al.*, 2010). Os resultados obtidos apontam para que o genótipo mais antigo seja ECSA, tendo surgido há pelo menos 500 anos (Volk *et al.*, 2010). Surpreendentemente, os dois genótipos africanos (WAF e ECSA) não surgiram no mesmo agrupamento filogenético apesar da proximidade geográfica (Volk *et al.*, 2010). Calcula-se que ECSA e WAF se tenham separado há mais de 100 anos, sendo a separação dos genótipos ECSA e Asiático mais recente, há cerca de 50 anos. Os dados filogenéticos sugerem ainda que o genótipo Asiático se tenha separado em 2 linhagens: a linhagem indiana, presumivelmente extinta; e a linhagem do sudoeste Asiático ainda em

circulação, tendo recentemente provocado um surto na Malásia (Kumarasamy *et al.*, 2006; Volk *et al.*, 2010; Arankalle *et al.*, 2007). As estirpes que actualmente circulam no Oceano Índico e no subcontinente Indiano constituem duas linhagens diferentes, ambas com origem na epidemia de 2004 no Quênia mas a primeira de proveniência insular (Ilha Lamu) e a segunda de proveniência continental, indicando diferentes origens dentro do genótipo ECSA para os surtos recentes na ilha da Reunião (2005) e na Índia (2006) (Volk *et al.*, 2010). O facto de não ter sido isolado nenhum vírus de genótipo Asiático em África, sugere uma evolução independente com vários séculos de separação (Ng *et al.*, 2010).

Observou-se que a evolução das linhagens de CHIKV enzoóticas é mais lenta que as das linhagens epidémicas. A evolução viral pode depender de factores intrínsecos (e.g., taxas de mutação e replicação) e de factores extrínsecos. Uma vez que não existe evidência de diferenças de taxas de mutação ou de replicação entre linhagens de CHIKV, as diferenças observadas deverão corresponder a diferentes taxas de transmissão que afectam a quantidade total de replicação por unidade de tempo e/ou diferenças na pressão selectiva. Nos ciclos epidémicos relativamente estáveis, o vírus é transmitido entre humanos por mosquitos peridomésticos abundantes que colonizam locais de armazenamento de água. Pelo contrário, a transmissão no ciclo enzoótico ocorre apenas em períodos de pluviosidade, quando a densidade dos vectores é maior. Igualmente, também neste caso a população de primatas é menos densa que a humana nos ciclos urbanos, baixando consequentemente a taxa de transmissão. Acresce ainda a maior diversidade de hospedeiros vertebrados e de vectores no ciclo enzoótico, o que pode conduzir a uma forte selecção purificadora das linhagens enzoóticas, *i.e.* valores de dN/dS mais baixos que os observados para as linhagens epidémicas (Volk *et al.*, 2010). Teoricamente, a selecção imune não deverá ter um papel importante na taxa evolutiva do CHIKV uma vez que, devido à imunidade duradoura induzida quando da infecção, a re-infecção não deverá ser comum.

Durante a epidemia da ilha da Reunião, foi detectada uma mutação com implicações a nível do *fitness* viral. Inicialmente as estirpes isoladas apresentavam na sequência da proteína E1 um resíduo alanina na posição 226 que, gradualmente com o decorrer da epidemia, foi substituído por uma valina na mesma posição em isolados da mesma região geográfica (Schuffenecker *et al.*, 2006). Ainda que não haja evidência do impacto desta mutação na virulência para o hospedeiro humano, foi demonstrado que aumenta a transmissibilidade do vírus em *Ae. albopictus*, provavelmente devido ao aumento da infecciosidade no intestino médio, tendo resultado em surtos explosivos onde este mosquito é abundante (Tsetsarkin *et al.*,

2007, 2009). O sucesso epidemiológico da variante E1-A226V é ainda evidenciado pelo facto de terem surgido mais dois eventos independentes que conduziram a esta mutação, um na Índia e outro nos Camarões ou no Gabão, constituindo um exemplo de convergência evolutiva raramente observado (Ng *et al.*, 2010)

1.3 A Doença

1.3.1 Apresentação clínica e diagnóstico laboratorial

A CHIKF afecta pessoas de ambos os sexos, de todas as idades, é autolimitante e apresenta sintomas incapacitantes que podem persistir, mas raramente é mortal (Deller *et al.*, 1968; Sudeep *et al.*, 2008). A apresentação clínica é de um modo geral semelhante à febre de Dengue, excepto quanto aos sintomas hemorrágicos e síndrome de choque que raramente são testemunhados em CHIKF (Hasebe *et al.*, 2002). Este facto faz com que, em países endémicos da Dengue, CHIKV possa passar despercebido (Her *et al.*, 2009). O período de incubação é em média de 2-4 dias seguindo-se os sintomas clássicos de CHIKF que são sobretudo febre alta abrupta acompanhada de artralgia grave, sintoma distintivo de CHIKF, mialgia, dores de cabeça, fotofobia e erupção cutânea (Borgeherini *et al.*, 2007; Queyriaux *et al.*, 2008). A artralgia ocorre predominantemente nos pulsos, joelhos, tornozelos e outras pequenas articulações (Pialoux *et al.*, 2007). Apesar da dificuldade de diagnóstico da doença nos estádios iniciais, o aparecimento de artralgia, devido ao seu carácter único, constitui um forte indício da infecção por CHIKV, facilitando o diagnóstico em países pobres sem recurso a técnicas de diagnóstico laboratorial mais sofisticadas como PCR (Her *et al.*, 2009). As infecções assintomáticas são raras. Nos indivíduos com evidência serológica de infecção, apenas cerca de 5% não tiveram sintomas óbvios (Das *et al.*, 2010).

Apesar dos sintomas agudos geralmente desaparecerem em menos de 2 semanas, e ser espectável a recuperação completa dos afectados, a artralgia poderá permanecer entre semanas a meses (Jain, 2008), ou originar incapacitação crónica em doentes idosos (Harley *et al.*, 2001). Porém, podem ocorrer outras complicações clínicas, tais como nefrite aguda, hepatite fulminante, pneumonia e miocardite (Her *et al.*, 2009, Das *et al.*, 2010). Estes quadros de complicações atípicas podem estar relacionados com condições clínicas pré-existentes como hipertensão, problemas respiratórios ou diabetes (Das *et al.*, 2010). Classicamente, o CHIKV não é considerado um vírus neurotrópico, porém nos últimos surtos

tem-se registado o envolvimento neurológico sob a forma de paralisia flácida aguda, meningoencefalite e encefalite (Das *et al.*, 2010). Na sequência da transmissão vertical do vírus, a encefalopatia é a manifestação clínica mais grave nos recém-nascidos (Gérardin *et al.*, 2008).

Durante o surto recente na Ilha de Reunião foram, pela primeira vez, descritas mortes associadas a CHIKV (Pialoux *et al.*, 2007; Mavalankar *et al.*, 2007), contabilizando-se a morte de 228 doentes com uma idade média de 78 anos (Quatresous, 2006). Contudo a associação entre o vírus e a falência multi-orgânica permanece sob investigação (Ligon, 2006). Apesar da baixa percentagem de casos atípicos e complicações severas (0.3%) observada quando do surto na Reunião, essa pequena percentagem poderá traduzir-se em números significativos com o aumento dos infectados (Her *et al.*, 2009).

Devido à ausência de profilaxia e tratamento específico da infecção por CHIKV, a detecção precoce e o diagnóstico correcto são fulcrais para a contenção de uma epidemia (Sudeep *et al.*, 2008). Segundo a OMS (2011) existem 3 ensaios laboratoriais principais utilizados no diagnóstico da infecção por CHIKV: isolamento do vírus, testes moleculares e testes serológicos.

Através do isolamento do vírus em laboratório de segurança BSL-3, é possível observar em diferentes tipos de culturas celulares (*e.g.* células BHK-21, HeLa e Vero) o efeito citopático produzido por CHIKV. Para tal é necessário fazer colheitas de sangue durante a fase virémica da doença. O efeito citopático deve então ser confirmado pela reactividade com anti-soro específico para CHIKV. Este método de diagnóstico pode demorar 1-2 semanas. A combinação do isolamento do vírus em cultura com testes de neutralização positivos é considerada um diagnóstico positivo para CHIKV.

A transcrição reversa seguida de reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem sido utilizada como técnica específica de detecção de regiões de RNA viral codificantes de 3 proteínas estruturais do vírus, a proteína da Cápside (C) e as proteínas do invólucro viral E1 e E2. A análise por RT-PCR só é possível durante a primeira semana após o início dos sintomas (Das *et al.*, 2010). Os resultados são conseguidos entre 1 a 2 dias, sendo que são considerados diagnósticos positivos para reacções de PCR positivas para uma ou mais das proteínas estruturais de CHIKV. Este tipo de ensaios torna-se dispendioso devido à necessidade de técnicos especializados e equipamento específico, no entanto a sua rapidez e precisão são uma vantagem em relação ao isolamento e aos testes serológicos (Sudeep *et al.*, 2008).

O diagnóstico de infecções por CHIKV pode ser feito demonstrando um aumento de 4x do título de IgG, determinado por ensaios imunoenzimáticos, entre amostras de soro colhidos na fase aguda e na fase de convalescença. Contudo, o teste mais utilizado é a detecção de IgM detectáveis, por *Immunoglobulin M Antibody (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay* (MAC-ELISA), entre 2 a 7 dias após o aparecimento de febre. Em caso de suspeitas de reactividade cruzada com vírus O'nyong-nyong ou vírus Semliki Forest, a confirmação deve ser obtida por testes de neutralização e Ensaio de Inibição da Hemaglutinação.

Alguns testes *in-house* também têm sido utilizados. A imunofluorescência indirecta revelou-se uma técnica útil na detecção de antígenos virais de amostras clínicas (Kuberski *et al.*, 1977; Yergolkar, 2006). Outras técnicas derivadas de PCR têm-se revelando úteis: RT-PCR/nested PCR para detecção específica e genotipagem de CHIKV (Pfeffer *et al.*, 2002; Hasebe *et al.*, 2002) e *Real-Time-PCR* vantajoso no diagnóstico, providenciando uma identificação e quantificação rápida, sensível, reprodutível e com reduzido risco de contaminação (Parida *et al.*, 2008).

1.3.2 Tratamento e Profilaxia

O tratamento da CHIKF recai apenas no alívio dos sintomas, sendo administrados analgésicos, antipiréticos, anti-inflamatórios não esteróides e, nos casos crónicos, glucocorticóides e metotrexato (Sudeep *et al.*, 2008, Das *et al.*, 2010). A utilização de antivirais como a ribavirina e o interferão ou de compostos básicos fracos como a cloroquina, que se revelou útil para alguns vírus de RNA, foi testada em doentes infectados com CHIKV. De um modo geral os ensaios demonstraram efeitos benéficos pouco pronunciados, resultados inconclusivos ou mesmo controversos (revisto em Burt *et al.*, 2011).

Actualmente, o método de controlo da infecção por CHIKV baseia-se na redução da exposição à picada por mosquitos vectores e, consequentemente no controlo das populações de vectores. Este tem como objectivos reduzir ou eliminar os criadores de mosquitos, matar larvas através do uso de larvicidas e reduzir o número de mosquitos adultos atrás de pulverização aérea com piretróides ou orgnofosfatos. A utilização de vestuário protector ou de redes mosquiteiras é também aconselhada como forma de protecção da picada de mosquitos infectados. No entanto, a experiência com o Dengue indica que o controlo da transmissão é

difícil e raramente conseguido, mesmo nos países mais desenvolvidos. Assim, idealmente o controlo do CHIKV deverá ser conseguido através de uma vacina.

Apesar do CHIKV ter sido identificado há mais de 50 anos e da sua circulação continuada em África e nalgumas partes da Ásia, não existe uma vacina aprovada contra o CHIKV. A extensão dos recentes surtos epidémicos de CHIKV e a inexistência de fármacos antivirais específicos para o tratamento da infecção, reavivaram a necessidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra este vírus. Idealmente, uma vacina contra uma doença endémica em países de baixos recursos, deverá induzir imunidade duradoura após administração de uma única dose, ser segura, *i.e.* apresentar baixo risco de reactividade secundária e de reversão da virulência no caso de vacinas atenuadas, e ainda baixo custo de produção.

Uma vacina candidata promissora surgiu nos anos 80 e consistiu numa vacina de vírus atenuado, designado por 181/25, desenvolvida por cientistas do *Walter Reed Army Institute of Research* a partir da estirpe 15561 Southeast Asian Human (Harrison *et al.*, 1971). O vírus foi obtido por passagens sucessivas em células MRC-5 e atenuado em células de roedores e primatas não humanos. Esta reuniu as características de atenuação requeridas (placas virais reduzidas, sensibilidade à temperatura, virulência reduzida em murganhos recém-nascidos e níveis baixos de virémia em macacos), e indução de um elevado título de anticorpos neutralizantes. No entanto a vacina não passou à fase II de ensaios clínicos devido a provocar artralgia transitória em 8% dos voluntários (Edelman *et al.*, 2000). Experimentalmente, também se demonstrou que esta estirpe atenuada era passível de transmissão pelo vector *Ae. aegypti* (Turell *et al.*, 1992).

Outra estratégia abordada foi a produção de uma vacina a partir de quimeras de alfavírus consistindo em proteínas não estruturais de vírus de encefalite equina Venezuelana ou de vírus Sindbis, combinadas com as proteínas estruturais de CHIKV (Wang *et al.*, 2008). Estas vacinas induziram em murganhos uma forte resposta humoral protectora contra CHIKV após uma única dose e, como originam títulos muito elevados em cultura, o custo de produção é mais reduzido. Contudo, possuíam capacidade de transmissão aos vectores naturais de CHIKV, o que determinou o seu abandono (Plante *et al.*, 2011).

No início dos anos 70, foram produzidas várias vacinas inactivadas contra CHIKV e uma delas chegou mesmo a ser testada num pequeno grupo de voluntários, tendo-se

demonstrado a indução de resposta neutralizante e sem efeitos adversos (Harrison *et al.*, 1971; Tiwari *et al.*, 2009).

As vacinas atenuadas, inactivadas ou quiméricas colocam problemas de segurança, nomeadamente quando da administração a indivíduos imunocomprometidos. Outros tipos de vacinas contra CHIKV mais seguras já abordadas incluem vacinas de DNA (Muthumani *et al.*, 2008; Mallilankaraman *et al.*, 2011) e outra de partículas tipo vírus (*virus-like particles*, VLPs) (Akahata *et al.*, 2010). As vacinas de DNA, consistindo em plasmídeos de expressão eucariótica das proteínas estruturais do CHIKV, induziram imunidade protectora em murganhos subsequentemente infectados e originaram títulos elevados de anticorpos neutralizantes em primatas não humanos (Mallilankaraman *et al.*, 2011). Porém, estas respostas imunes foram conseguidas após várias imunizações (3 a 5) o que poderá reduzir a sua eficácia na vacinação de humanos e implicar custos avultados de produção.

As VLPs baseiam-se na formação espontânea de partículas, estruturalmente semelhantes a vírus nativos, a partir de proteínas virais estruturais expressas por via recombinante. Uma vez que não são infecciosas por não possuírem genoma viral e ao simularem a configuração natural dos vírus, as VLPs constituem uma alternativa segura às vacinas atenuadas e inactivadas, e possuem um potencial imunogénico mais elevado que as vacinas de subunidades. A provar o seu potencial como vacinas está o facto de existirem duas vacinas comerciais baseadas em VLPs (papilomavírus humano e vírus da hepatite B). A imunização com VLPs revelou-se protectora num modelo símio para a infecção com CHIKV e mais imunogénica que as vacinas de DNA, o que faz das VLPs uma aposta promissora a vacina (Akahata *et al.*, 2010).

Objectivos

Recentemente, foi descrita a produção de *virus-like particles* (VLPs) de CHIKV em células de mamífero transfectadas e demonstrada a sua eficácia imunogénica e protectora num modelo símio da infecção por CHIKV (Akahata *et al.*, 2010). Porém, a tecnologia associada a este tipo de produção é de elevado custo e incomportável para os países de baixos recursos económicos em risco ou onde o vírus actualmente circula. Uma forma de ultrapassar esta desvantagem será produzir VLPs de CHIKV num sistema eucariótico alternativo eficiente e menos dispendioso. Os baculovírus recombinantes constituem uma forma eficaz de produzir grandes quantidades de proteínas virais altamente imunogénicas em condições de biocontenção baixa e têm sido extensivamente usados para produzir antígenos para imunização. Um exemplo importante desta utilização é a vacina para papilomavírus disponível no mercado (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals) que consiste em VLPs produzidas por baculovírus recombinantes em células de insecto. Assim, e considerando ainda que o CHIKV é um arbovírus, pretendemos produzir VLPs de CHIKV no sistema baculovírus/células de insecto.

Uma vez que a sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV tem cerca de 3,7 Kb existe uma forte possibilidade de gerar baculovírus recombinantes com esta ORF truncada devido à introdução de erros durante a sua amplificação. Assim, inserido no âmbito do mestrado em Ciências Biomédicas, tivámos como principal objectivo obter um plasmídeo recombinante capaz de expressar as proteínas estruturais de CHIKV e produzir VLPs em células eucarióticas transfectadas, como passo prévio à produção de VLPs no sistema baculovírus/células de insecto.

Para atingir o fim pretendido, foi necessário completar várias etapas com os seguintes objectivos específicos:

- Transcrever e amplificar o cDNA correspondente à ORF codificante da poliproteína estrutural de CHIKV;
- Clonar o produto amplificado no vector de expressão eucariótico pLEXM e fazer o *screening* dos plasmídeos recombinantes;
- Transfectar os plasmídeos recombinantes em células HEK 293T;

- Detectar a síntese de proteínas virais recombinantes através de imunofluorescência indirecta e *Western blotting* em extractos celulares totais e precipitados de sobrenadantes de culturas celulares;
- Confirmar por microscopia electrónica a presença de VLPs nas células transfectadas com os plasmídeos cujos resultados de *Western blotting* indiquem tal ocorrência.

2.

Material e Métodos

2.1 Isolamento de RNA viral

O isolamento de RNA viral de CHIKV estirpe S27, foi feito utilizando o *kit* de extracção rápida *Instant Virus RNA* (Analytikjena, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA viral foi isolado a partir de 150 µl de sobrenadante de cultura de células *Vero* infectadas com CHIKV. A etapa de lise dos viriões foi executada em câmara de fluxo laminar em laboratório de segurança BSL-3. A eluição do RNA viral retido nas colunas foi feita com 30 µl de água sem RNases e a solução distribuída por vários microtubos e armazenada a -80°C até futura utilização.

2.2 Síntese de cDNA

A reacção de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA a partir de RNA de CHIKV foi feita recorrendo ao *kit* comercial *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, Lituânia). Foram seguidas as indicações do fabricante, efectuando um passo preliminar de desnaturação do RNA viral. Este tratamento prévio consistiu em colocar um tubo *ependorf* contendo 10 µl do RNA viral extraído e 2µl do *primer* CKSo_R (descrito na tabela 2.1, 10pmoles/µl), num banho-maria a 65°C, durante 5 minutos, e depois colocado em gelo. Seguiu-se a adição dos restantes constituintes da reacção: 4 µl de tampão RT (5x), 1 µl de *Ribolock RNase Inhibitor* (20 U/ µl), 2 µl de desoxirribonucleótidos (dNTPs, 10 mM) e 1 µl de transcriptase reversa (200 U/µl), para um volume final de 20 µl. As reacções de transcrição reversa foram executadas num termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid, Reino Unido) de acordo com o programa apresentado na tabela 2.2.

Tabela 2.1 *Primers* utilizados em síntese de cDNA e amplificação por PCR da sequência nucleotídica correspondente à poliproteína estrutural de CHIKV. As sequências sublinhadas indicam locais de reconhecimento gerados para as enzimas de restrição SacI (GAGCTC) e NotI (GCGGCCGC). A caixa cinzenta indica a sequência Kozak canónica.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Localização no genoma de S27
CKSac2_F	GTACCTGAGCTCTAATCAGCCACCATGG	7543 - 7570
CKSac3_F	AACAGAGCTCAGCTACAATGGAGTTCATC C	7550 - 7579
CKSac4_F	GTAACCTTTGTACGGCGGTCCTAAA	7474 - 7498
CKSi_R	CCTTCATGCTGCGGCCGCAAGTTAGTGCC	11306 - 11334
CKSo_R	TAGGGGACACATATACCTTCATGC	11326 - 11349

Tabela 2.2 Condições utilizadas na reacção de transcrição reversa de RNA de CHIKV.

	Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
Extensão	45	60 min	1
Inactivação da Enzima	70	15 min	1

2.3 Amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV por *nested-PCR*

Tabela 2.3 Condições utilizadas na 1ª reacção de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV a partir de cDNA.

	Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	92	2 min	1
Desnaturação	92	10 s	10
Hibridação	65	10 s	
Extensão	68	3 min	
Desnaturação	92	15 s	15
Hibridação	65	30 s	
		3 min	
Extensão	68	+20s/ciclo	
Extensão final	68	7 min	1

Tabela 2.4 Condições utilizadas na 2ª reacção de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV a partir do produto da 1ª reacção de PCR.

	Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	92	2 min	1
Desnaturação	92	10 s	3
Hibridação	55	10 s	
Extensão	68	3 min	
Desnaturação	92	15 s	7
Hibridação	65	30 s	
		3 min	
Extensão	68	+20s/ciclo	
Desnaturação	92	15 s	20
Hibridação	65	30 s	
		3 min	
Extensão	68	+20s/ciclo	
Extensão final	68	7 min	1

Na tabela 2.1 estão descritos os *primers* usados na amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV, os quais foram solubilizados em água sem RNases para uma concentração final de 200 pmoles/ μ l (solução stock).

Para a amplificação da sequência nucleotídica completa correspondente à poliproteína estrutural de CHIKV ($\approx 3,7$ kb), foi seguida uma estratégia de amplificação em 2 passos, *nested-PCR*, efectuando-se uma primeira reacção de amplificação utilizando o par de *primers* externos CKSac4_F/CKSo_R, seguida de uma segunda reacção de amplificação com condições de hibridação mais restritivas utilizando o par de *primers* internos CKSac2_F/CKSi_R ou CKSac3_F/CKSi_R. Tanto a primeira como a segunda reacção foram executadas no termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid, Reino Unido), nas condições apresentadas na tabela 2.3 e 2.4, respectivamente.

Utilizou-se o sistema de amplificação comercial *Expand Long Template PCR System* (Roche, Suíça) indicado para amplificação de fragmentos longos. Como tal, as misturas de reacção foram adaptadas do indicado pelo fabricante, sendo a mistura para a primeira amplificação constituída por 34,5 μ l de água Milli-Q, 1,75 μ l dNTPs (10 mM), 5 μ l de tampão 1X e 1,5 μ l de cada um dos *primers* CKSac4_F e CKSo_R (10 pmoles/ μ l), pré-aquecidos a 37°C e adicionados em câmara de fluxo laminar. A estes adicionaram-se ainda 5 μ l de cDNA de CHIKV e 0,75 μ l de mistura das enzimas Taq DNA polimerase e Tgo DNA polimerase, sendo aplicado vórtex suave e centrifugação breve antes de iniciar a reacção. A segunda mistura de reacção foi executada de forma idêntica, mas adicionando 1 μ l de produto da primeira reacção, numa diluição de 1:10, e usando o par de *primers* CKSac2_F/CKSi_R ou CKSac3_F/CKSi_R. Os produtos de reacção foram resolvidos em gel de 0,7 % de agarose, em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato, 1mM EDTA) 0,5X e com corrente constante de 70V. Após 2 horas, visualizaram-se as bandas correspondentes às sequências nucleotídicas amplificadas, coradas com brometo de etídio, sob luz ultra-violeta.

2.4 Extracção de DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídico foi feita para os plasmídeos pLEXm e pLCHIKS, utilizando o *kit Qiagen Plasmid Purification-mini* (Qiagen, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Partindo de um volume de 4 ml de cultura de *E. coli*, estirpe JM109

transformada, crescida durante a noite, 37°C, 220 rpm, foram obtidos aproximadamente 7 µg de DNA plasmídico final, eluídos em 30 µl de água.

2.5 Clonagem da sequência completa codificante da poliproteína estrutural de CHIKV em pLEXm

2.5.1 Purificação de DNA

A purificação de moléculas de DNA resultantes de PCR e de digestões com enzimas de restrição, foi feita recorrendo ao kit comercial *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Alemanha) para moléculas entre 100 pb e 10 kpb. Foram seguidas as indicações do fabricante, tendo-se obtido uma eficiência de recuperação de 80-90%.

2.5.2 Digestões com enzimas de restrição

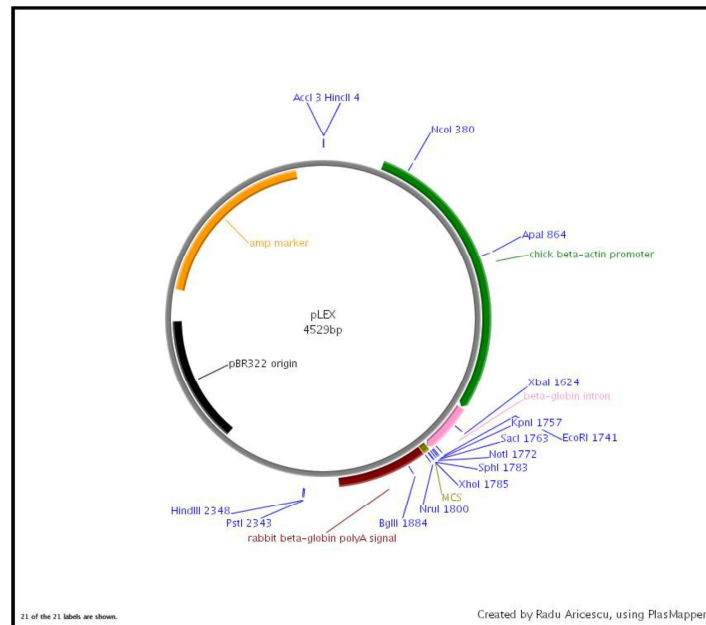


Figura 2.1 Mapa genómico do vector pLEXm. Adaptado de Aricescu *et al.*, 2006.

Para a clonagem dirigida, o fragmento de DNA purificado (≈3,7 kb) resultante de RT-PCR e o vector pLEXm (gentilmente cedido por Radu Aricescu, *Wellcome Trust Center for Human Genetics, Oxford University*) (Figura 2.1) foram digeridos com as enzimas de restrição SacI (*Fermentas*, Lituânia) e NotI FastDigest (*Fermentas*, Lituânia). Usou-se um

protocolo adaptado das indicações do fabricante recorrendo a um passo intermédio de diálise para remoção do tampão da primeira digestão. Resumidamente, 5 µl de vector (≈ 1 µg de DNA), foram digeridos com 1 µl de enzima NotI *FastDigest*, em 2 µl de tampão da enzima NotI (10x) num volume total de 20 µl. Após agitação suave e centrifugação rápida, a mistura de digestão foi incubada 2 horas a 37°C. Seguidamente, a mistura de digestão foi dialisada durante 1 hora, à temperatura ambiente, contra água destilada, usando discos de diálise de 0,025 µm VSWP (*Millipore*, Irlanda). O volume recuperado dos discos de diálise foi acertado para se proceder à digestão com 1,5 µl de enzima SacI (1800U), 3 µl de tampão SacI (1x), num volume total de 30 µl. A mistura foi deixada durante a noite a 37°C. O mesmo procedimento foi efectuado para a digestão do inserto de CHIKV partindo de 1 µl de produto de RT-PCR purificado ($\approx 0,2$ µg de DNA). Por fim, ambos os produtos de digestão (pLEXm e inserto) foram purificados, como descrito em 2.5.1, e eluídos em 30 µl de água.

2.5.3 Reacção de ligação

A ligação dirigida do plasmídeo pLEXm e do inserto codificante da poliproteína estrutural de CHIKV, previamente digeridos e purificados, foi realizada com o *kit Quick Ligation* (*NewEngland Biolabs*, EUA) seguindo as indicações do fabricante. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a proporção molar de 1:3 (vector:inserto).

2.5.4 Transformação de células competentes

Células de *E.coli*, estirpe JM109 (genótipo endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)) foram transformadas com a mistura de ligação anterior. A selecção das colónias transformantes baseou-se no marcador de resistência à ampicilina presente no vector.

Para obtenção de células *E. coli* competentes para transformação, a um nefalómetro com 20 ml de meio LB líquido (1% tripton, 0,5% extracto de levedura, 1% NaCl em água destilada, pH 7) foram adicionados 200 µl de uma cultura saturada de bactérias crescidas durante a noite. A cultura foi deixada a crescer a 37°C, durante 45 minutos, com agitação (220 rpm), até uma densidade óptica entre 0.3-0.5 (comprimento de onda 600 nm). A cultura foi então transferida para um tubo de centrífuga *oak ridge* arrefecido e centrifugada a 3300 xg durante 10 minutos, a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de TSS frio (10% PEG, 5% dimetilsulfóxido, 20mM MgCl₂ em meio LB).

A suspensão de células (100 µl) foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 ml arrefecido em gelo, a que se adicionou 4 µl da mistura de ligação fria. A suspensão foi mantida em gelo durante 30 minutos, transferida para um banho-maria a 42°C 90 segundos e colocada novamente em gelo durante 5 minutos. Após o choque térmico foram adicionados à suspensão 900 µl de meio LB líquido e o tubo agitado suavemente, a 37°C, durante 1 hora.

Por último, 100 µl de células foram directamente semeadas em placas de LB sólido (1% triptona, 0,5% extracto de levedura, 1% NaCl, 1,5% agar em água destilada, pH 7) com 100 µg/ml de ampicilina. A restante mistura foi centrifugada durante 1 minuto a 16000 xg e rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento de células no meio de cultura residual e semeou-se em LB sólido como anteriormente.

2.5.5 Detecção de clones bacterianos recombinantes

Para a detecção de colónias bacterianas transformadas com pLEXm recombinante tendo inserido DNA de CHIKV, foi realizado um *screening* de aproximadamente 100 colónias. Este consistiu, numa primeira fase, na extracção de DNA plasmídico e análise do perfil electroforético em gel de 0,7% de agarose. As colónias isoladas foram repicadas em 2 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml de ampicilina e crescidas durante a noite a 37°C, com agitação a 220 rpm. As culturas foram então transferidas para tubos eppendorf de 2 ml e centrifugadas a 16000 xg durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 300 µl de TE/RNase (10 mM Tris-HCl, pH8, 1 mM EDTA e RNase 100 µg/ml) frio, seguido da adição de 300 µl tampão de lise (NaOH 0,2 M, 1% SDS) e mistura por inversão. Após 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se tampão de neutralização frio (KOAc 3 M, pH 5.5), misturou-se por inversão e deixou-se 15 minutos em gelo. Seguiu-se centrifugação a 16000 xg durante 15 minutos e remoção do sobrenadante para novos tubos eppendorf de 2 ml contendo 0,7 volumes de isopropanol. Após vórtex, centrifugou-se a 16000 xg, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com 500 µl de etanol a 70%, centrifugado a 16000 xg 5 minutos e secado o sedimento sob vácuo. A hidratação dos ácidos nucleicos precipitados foi feita com 30 µl de água destilada, a que se seguiu electroforese em gel de 0,7% de agarose como anteriormente.

As colónias contendo DNA plasmídico com tamanho superior ao vector não recombinante, foram sujeitas a dois passos de *screening* adicionais: digestão com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem dirigida, seguida de análise do padrão electroforético e sequenciação. A digestão dos clones foi efectuada com SacI/NotI, como referido

anteriormente em 2.5.2. A sequenciação dos plasmídeos purificados foi efectuada numa cadeia, usando o *primer* 5'-GCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATC-3' complementar da sequência do vector a montante do local de ligação 5' SacI. A sequenciação foi realizada pela empresa STAB VIDA (Portugal).

2.6 Transfecção de células HEK 293T

Células aderentes HEK 293T (linha contínua de rim embrionário humano cedida pelo NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) foram crescidas em meio de cultura DMEM (Lonza, Bélgica) suplementado com L-glutamina 1 mM, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, piruvato de sódio 1 mM, 10% de soro fetal bovino (Lonza, Bélgica) e aminoácidos não essenciais 0,1 mM (Sigma-Aldrich, EUA) a 37°, em atmosfera húmida de 5% de CO₂. As células foram subcultivadas a cada 3 dias por ressuspensão em meio de cultura e transferência para novos frascos numa proporção de 1:10. O meio foi mudado 2 dias após cada passagem. Os ensaios de transfecção foram feitos em monocamadas de células HEK 293T semeadas de véspera em placas de 35 mm (p35) apresentando 80-90% de confluência. O reagente de transfecção usado foi polietilenimina (PEI) ramificada, de peso molecular 25 kDa (Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução de trabalho consistiu 1mg/ml de PEI ajustado a pH 7 com HCl e esterilizado por filtração. Para a transfecção de culturas em p35, 4 µg de DNA plasmídico (0,5 µg/µl em água), foram adicionados a 400 µl de meio DMEM sem soro e sem antibióticos. Misturou-se e adicionou-se 6 µl de PEI numa proporção molar de 1:1,5 (DNA:PEI). Após vórtex rápido, a solução permaneceu 10 minutos à temperatura ambiente. Durante este tempo, o meio de cultura das células a transfectar foi substituído por meio suplementado com 2% de soro fetal bovino. Os complexos de DNA-PEI foram então adicionados gota a gota com micropipeta e as células incubadas a 37°C, 5% CO₂, 48 horas. O controlo da eficiência da transfecção foi feito procedendo paralelamente à transfecção do plasmídeo repórter pEGFP-delta (gentilmente cedido pelo Prof. Celso Cunha), o qual expressa uma proteína de fusão EGFP-antigénio delta pequeno sob o comando do promotor de precoce imediato de citomegalovírus.

2.7 Infecção de culturas celulares com CHIKV

Culturas de células HEK 293T subconfluentes, a que foi removido o meio de cultura, foram inoculadas com aproximadamente 0,1 volumes de inóculo viral ($moi = 0,1$ pfu/célula). Após 1 hora de adsorção a 37°C com agitação ocasional, o inóculo foi removido e adicionado DMEM com 2% de soro fetal bovino. A cultura infectada foi incubada durante 16-24 horas, altura em que o efeito citopático é completo.

2.8 Precipitação de partículas virais/VLPs com PEG

O sobrenadante de cultura clarificado (centrifugado a 16000 xg, 2 minutos) das células transfectadas com vectores de expressão recombinantes ou infectadas com CHIKV, foi precipitado com polietilenoglicol (PEG), como descrito por Gould *et al.* (1985), para concentração de VLPs ou de partículas virais. Resumidamente, ao sobrenadante de cultura adicionaram-se NaCl para uma concentração final de 0.1M e PEG 8000 (*Sigma*, EUA) para 10%, deixando-se durante a noite, com agitação suave, a 12°C. Após centrifugação de 30 minutos a 16000 xg, 4°C, o sedimento foi ressuspensão em 40 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, 25% (v/v) de glicerol, 2% de SDS, 0,1% de DTT, 0,01% de azul de bromofenol), fervido 5 minutos em banho-maria e guardado a -20°C até futura utilização.

2.9 Análise de proteínas por SDS-PAGE e Western blotting

Para a detecção da síntese de proteínas de CHIKV em células HEK 293T transfectadas com o vector de expressão pLEXm recombinante, células HEK 293T infectadas ou precipitados de PEG, procedeu-se à separação de extractos celulares totais ou precipitados por electoforese em géis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), a que se seguiu transferência para membranas de nitrocelulose, incubação com anti-soro específico e detecção dos anticorpos ligados.

2.9.1 Preparação de extractos proteicos

As culturas de células transfectadas com vectores de expressão recombinantes, ou infectadas com CHIKV, crescidas em placas p35, foram colhidas por ressuspensão 48 h após transfecção ou 24 h, respectivamente, após infecção. Após 2 minutos de centrifugação a 16000 xg, sedimentos celulares e sobrenadantes foram separados, sendo os sobrenadantes processados como descrito em 2.8. Os sedimentos das amostras correspondentes aos extractos totais celulares, foram ressuspensos em 40 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidos 5 minutos e guardados a -20°C para futura utilização.

2.9.2 SDS-PAGE

A separação dos extractos totais celulares e dos sobrenadantes de cultura precipitados foi feita em géis de SDS-PAGE, sistema tampão de Laemmli, usando o sistema *Mini-Protean® 3 Cell* (Bio-Rad, EUA). O gel de resolução consistiu numa solução de 12% de acrilamida/bis (mistura comercial 37,5:1, Bio-Rad, EUA), 0,1% de SDS, Tris-HCl 375 mM pH8,8. O gel de concentração consistiu em 4% acrilamida/bis, 0,1% de SDS, Tris-HCl 125 mM pH6,8. Ambos os géis foram polimerizados pela adição de persulfato de amónio e TEMED, concentração final de 0,05% e 0,0005%, respectivamente. Os géis foram corridos a 200V, durante aproximadamente 1 hora, usando como electrólito Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% (p/v) de SDS em água destilada, pH 8,3.

2.9.3 Western blotting

Após separação das proteínas, estes foram transferidos para membrana de nitrocelulose *Hybond™ ECL™ Nitrocellulose Membrane* (Amersham, EUA) utilizando o aparelho *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, EUA). A *sandwich* de transferência foi montada em tampão de transferência Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% (v/v) de metanol) colocando 3 folhas de papel cromatográfico 3MM (*Whatman*, Reino Unido), membrana de nitrocelulose, gel, 3 folhas de papel 3MM. A transferência ocorreu a 500 mA durante 75 minutos.

Após a transferência, a membrana foi incubada durante a noite a 4°C em tampão de bloqueio [TBST (Tris-HCl 0,1 M pH7,5, NaCl 150 mM, 0,05% (v/v) Tween 20) suplementado com 10% leite em pó desnatado (*Bio-Rad*, EUA)]. De seguida, esta foi incubada com soro policlonal de murganho anti-Chikungunya diluído a 1:1000 no tampão de

tampão de bloqueio atrás descrito, durante 90 minutos. Após uma lavagem breve em TBST, foram executadas 3 lavagens de 10 minutos cada no mesmo tampão, seguidas de incubação com anticorpo anti-IgG de murganho produzido em coelho e conjugado com peroxidase (*Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase*, #A9044, *Sigma-Aldrich*, EUA), diluído a 1:160000 em tampão de bloqueio, durante 1 hora. Por fim, foi feita uma breve lavagem em TBST, seguida de 3 lavagens de 10 minutos cada, na mesma solução.

A detecção específica de anticorpos ligados foi efectuada por revelação da membrana com o kit *Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection* (*GE Healthcare*, Reino Unido) seguindo as instruções do fabricante e utilizando filme *Amersham Hyperfilm ECL* (*GE Healthcare*, Reino Unido).

2.10 Detecção de proteínas virais por microscopia de fluorescência

Para a detecção da produção de proteínas virais em células HEK 293T por imunofluorescência, culturas celulares foram crescidas sobre lamelas de vidro (2 mm x 2 mm) colocadas em placas de cultura de 35 mm e transfectadas com pLEXm ou com os diferentes plasmídeos recombinantes pLCHIKS, como descrito em 2.6, ou infectadas com CHIKV (*moi* = 0,1 *pfu/célula*). 48 horas pós-transfecção e 24 horas pós-infecção, procedeu-se à fixação e coloração seguindo um protocolo de imunofluorescência indirecta.

Ao meio de cultura das células HEK 293T foram adicionados 2 ml de uma solução de 4% de paraformaldeído (*Sigma-Aldrich*, EUA) em PBS (*Lonza*, Bélgica) para uma concentração final de 2% paraformaldeído, seguindo-se uma incubação à temperatura ambiente, durante 5 minutos. De seguida removeu-se a mistura, substituindo-a por 2 ml da solução a 4% de paraformaldeído e a fixação prosseguiu à temperatura ambiente durante mais 20 minutos. Para algumas preparações foi efectuado um passo adicional de permeabilização. Este consistiu, no seguimento do protocolo de fixação, numa breve lavagem com PBS e tratamento das culturas com 1,5 ml de *Triton® X100* a 1% (*Sigma*, USA) em PBS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

À fixação seguiu-se uma lavagem com PBS e incubação das culturas em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado, glicina 0,3 M em PBS) durante 3 horas. Após lavagem

com PBS, seguiu-se a incubação com soro policlonal anti-Chikungunya, diluído a 1:180 numa solução de 2% de BSA (Fracção V, *Sigma-Aldrich*, EUA) em PBS, 2 horas, com agitação suave, à temperatura ambiente. Finda a incubação, seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos em PBS.

Como conjugado, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de murganho (específico para Fab) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (*Anti-mouse IgG (Fab-specific)-FITC*, # F4018, *Sigma-Aldrich*, EUA), diluído a 1:150 em PBS. A incubação das lamelas de culturas celulares decorreu durante 1 hora na ausência de luz, com agitação suave e à temperatura ambiente. A solução de conjugado foi então removida, lavadas as culturas 3 vezes com PBS, 5 minutos cada, prosseguindo-se depois para a montagem das lamelas. Numa lâmina limpa e identificada, foi colocada uma gota de meio de montagem *Fluoroshield* (*Sigma-Aldrich*, EUA), sobre a qual foi colocada a lamela. De seguida isolou-se a montagem com verniz para evitar desidratação da preparação e guardou-se a 4°C, na ausência de luz, até observação. A visualização das preparações foi efectuada num Microscópio de fluorescência *MOTIC®* (comprimento de onda entre 450 e 490 nm) e as imagens de imunofluorescência obtidas através da câmara *MOTICAM 2300 3.0 MP* acoplada, disponibilizados gentilmente pela Dr^a Luísa Vieira e colaboradores.

2.11 Preparação de amostras para microscopia electrónica

Às culturas de células HEK 293T transfectadas com pLEXm ou com clones recombinantes de pLEXm, e infectadas com CHIKV, foi removido o meio de cultura, adicionado 1,5 ml de fixador (10% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3) e a fixação decorreu durante 1 hora. De seguida foi retirada a solução de fixação e adicionado 1,5 ml de tampão cacodilato de sódio. As células foram então raspadas e colhidas para tubos eppendorf. Após centrifugação, desprezou-se o excesso de tampão, e colocaram-se as células em ambiente refrigerado, a 4°C, até ao seu processamento para microscopia electrónica de transmissão. Este foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral pelo Dr. A. P. Alves de Matos.

3.

Resultados

3.1 Amplificação do gene da poliproteína estrutural de CHIKV por *nested-PCR*

Após síntese de cDNA por transcrição reversa a partir de RNA genómico de CHIKV, a amplificação da sequência codificante da poliproteína de CHIKV foi conseguida realizando um *nested-PCR*. Como resultado da primeira reacção, observaram-se duas bandas em gel de agarose com tamanhos moleculares diferentes. A primeira banda apresentou uma migração equivalente a um fragmento de cerca de 3,7 kpb, ao passo que a segunda banda, de menor massa molecular e em maior concentração, apresentou um tamanho de cerca de 2,3 kpb (Figura 3.1A). Uma segunda reacção de PCR em que se introduziu um novo *primer* CKSac3_F (Tabela 2.1) para amplificação, permitiu eliminar a banda de menor dimensão e

obter apenas uma banda de cerca de 3,7 kb correspondente ao tamanho esperado resultante da amplificação específica da sequência nucleotídica codificante da poliproteína estrutural do CHIKV (Figura 3.1B).

Numa tentativa de substituir a sequência de reconhecimento pelos ribossomos presente no mRNA 26S viral por uma sequência kozak canônica, desenhou-se o *primer* CKSac2_F (Tabela 2.1) para usar na segunda reacção de PCR. Porém não foi conseguido qualquer produto de amplificação com este *primer*.

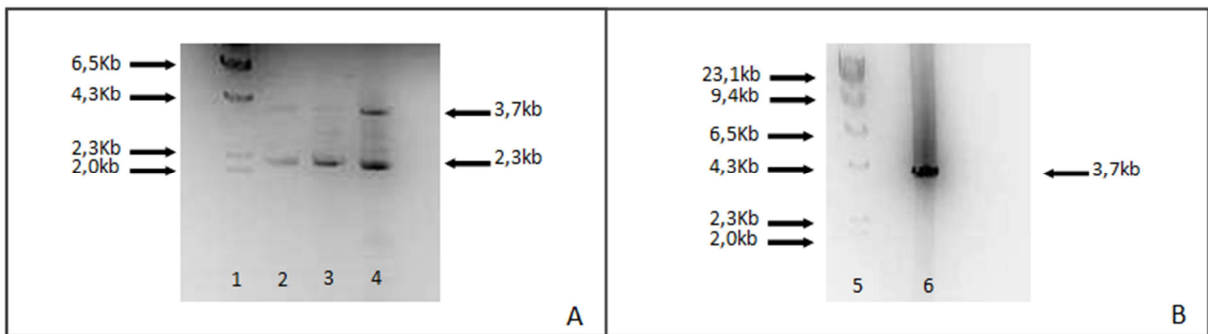


Figura 3.1 Separação em gel de 0,7% de agarose dos produtos da primeira reacção (A) e da segunda reacção (B) de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante das proteínas estruturais de CHIKV. Pistas 2-4 produtos resultantes de três reacções diferentes da primeira reacção. Pista 6 produto da segunda reacção. Pistas 1 e 5 marcador molecular Lambda DNA HindIII, *Fermentas*.

3.2 Obtenção de vectores de expressão recombinantes

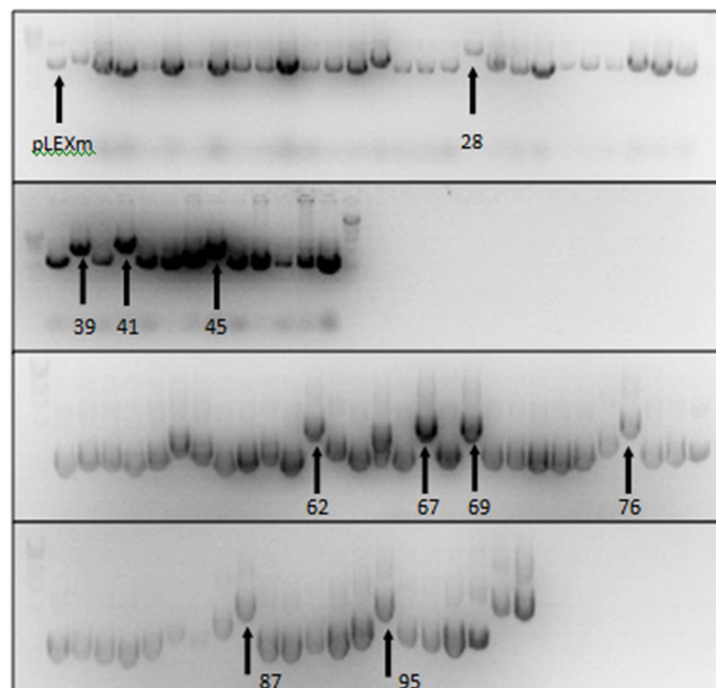


Figura 3.2 *Screening* de vectores pLEXm recombinantes em transformantes de *E. coli*. Como controlo foi migrado paralelamente o plasmídeo selvagem pLEXm.

Extraíu-se DNA plasmídico de cerca de 100 colónias transformantes individuais, para avaliar a migração do mesmo em géis de agarose, comparativamente com o plasmídeo selvagem pLEXm (Figura 3.2). Foram detectados 10 clones cujos plasmídeos apresentavam velocidades de migração substancialmente mais lentas comparativamente com o plasmídeo selvagem, nomeadamente os clones 28, 39, 41, 45, 62, 67, 69, 76, 87 e 95 (Figura 3.2) e que poderiam corresponder a plasmídeos recombinantes com insertos de grandes dimensões.

Quando digeridos com as enzimas utilizadas na clonagem dirigida (SacI e NotI) e resolvidos em gel de 0,7 % agarose, todos os plasmídeos seleccionados apresentaram um perfil de bandas semelhante. No controlo foi observada uma banda única de cerca de 4,5 kpb correspondente ao plasmídeo pLEXm linearizado. Nos plasmídeos transformantes foram observadas duas bandas: uma de tamanho molecular semelhante ao controlo e outra banda com cerca de 3,7 kpb (Figura 3.3), correspondente ao tamanho de inserto que pretendíamos clonar.

Após sequenciação dos insertos dos 10 plasmídeos seleccionados, apenas 6 destes (pLCHICKS28, pLCHICKS45, pLCHICKS62, pLCHICKS67, pLCHICKS69 e pLCHICKS76) apresentaram o codão de iniciação e sequências flanqueantes correctas.

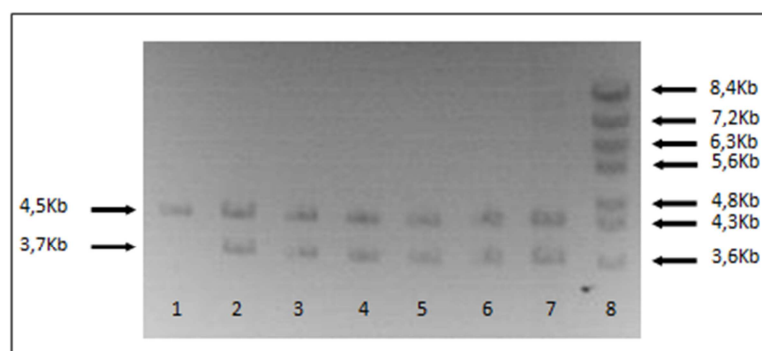


Figura 3.3 Digestão com SacI e NotI de pLEXm (B), pLCHICKS28 (C), pLCHICKS45 (D), pLCHICKS62 (E), pLCHICKS67 (F), pLCHICKS69 (G) e pLCHICKS76 (H). (A) Marcador Lambda DNA Eco91I (BstEII), *Fermentas*.

3.3 Expressão de proteínas virais: análise por microscopia de fluorescência

Numa primeira avaliação da síntese de proteínas virais a partir das sequências clonadas em pLEXm, foram efectuados ensaios de imunofluorescência indirecta em células HEK 293T transfectadas com os plasmídeos pLCHICKS 28, 45, 62, 67, 69 e 76. Como

reagente de transfecção usou-se uma solução de polietilenimina (Durocher *et al.*, 2002) que apresentou a vantagem de ser manifestamente menos dispendiosa que os reagentes de transfecção convencionais comercializados. A utilização do plasmídeo repórter pEGFP-delta como controlo da técnica de transfecção, permitiu avaliar a eficiência do método utilizado. A observação por microscopia de fluorescência de preparações de células não transfectadas (Figura 3.4A) e transfectadas com o plasmídeo pEGFP-delta (Figura 3.4B) demonstrou uma elevada eficiência de transfecção, estimando-se que mais de 80% das células emitiam fluorescência.

Devido a não haver um protocolo de imunofluorescência previamente estabelecido, numa primeira fase foi necessário optimizar as condições de fixação, bloqueio e diluições do soro policlonal anti-CHIKV e do conjugado a utilizar. Foram obtidos melhores resultados utilizando dois passos de fixação consecutivos, em que no primeiro passo é adicionado o fixador paraformaldeído directamente ao meio de cultura (concentração final de 2%). A utilização de leite em pó desnatado a 5% no tampão de bloqueio revelou-se mais eficaz que a albumina sérica bovina na eliminação de fluorescência inespecífica. Ainda, a adição de glicina 0,3 M ao tampão de bloqueio permitiu reduzir mais a fluorescência de fundo. Quanto à diluição do soro policlonal anti-CHIKV e do conjugado, diluições de 1:180 do soro anti-CHIKV e de 1:150 do conjugado, com incubações de 2 e 1 hora respectivamente, revelaram-se o melhor compromisso.

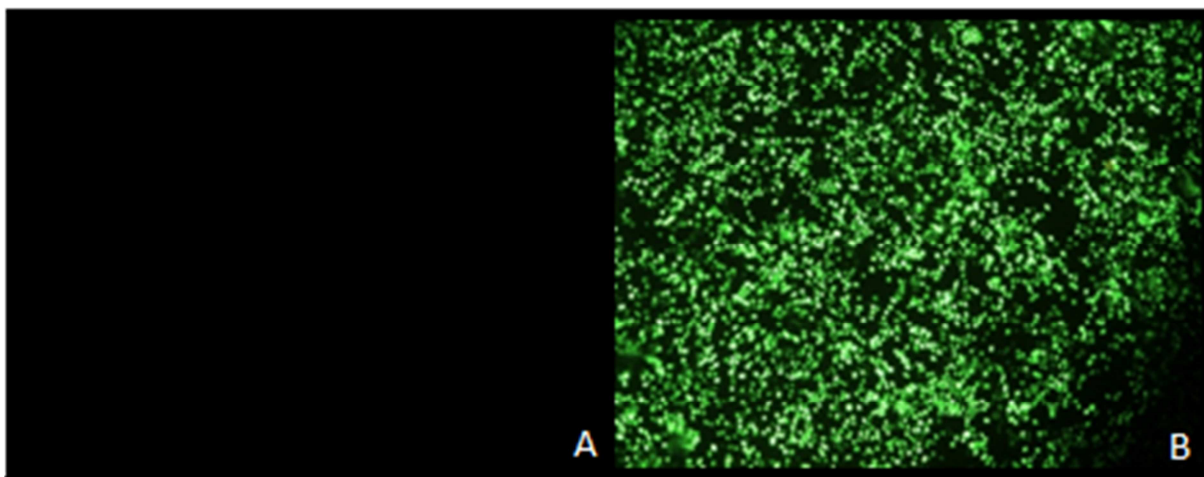


Figura 3.4 Imagens de células HEK 293T (A) e células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pEGFP-delta (B) observadas em microscopia de fluorescência (ampliação 100x).

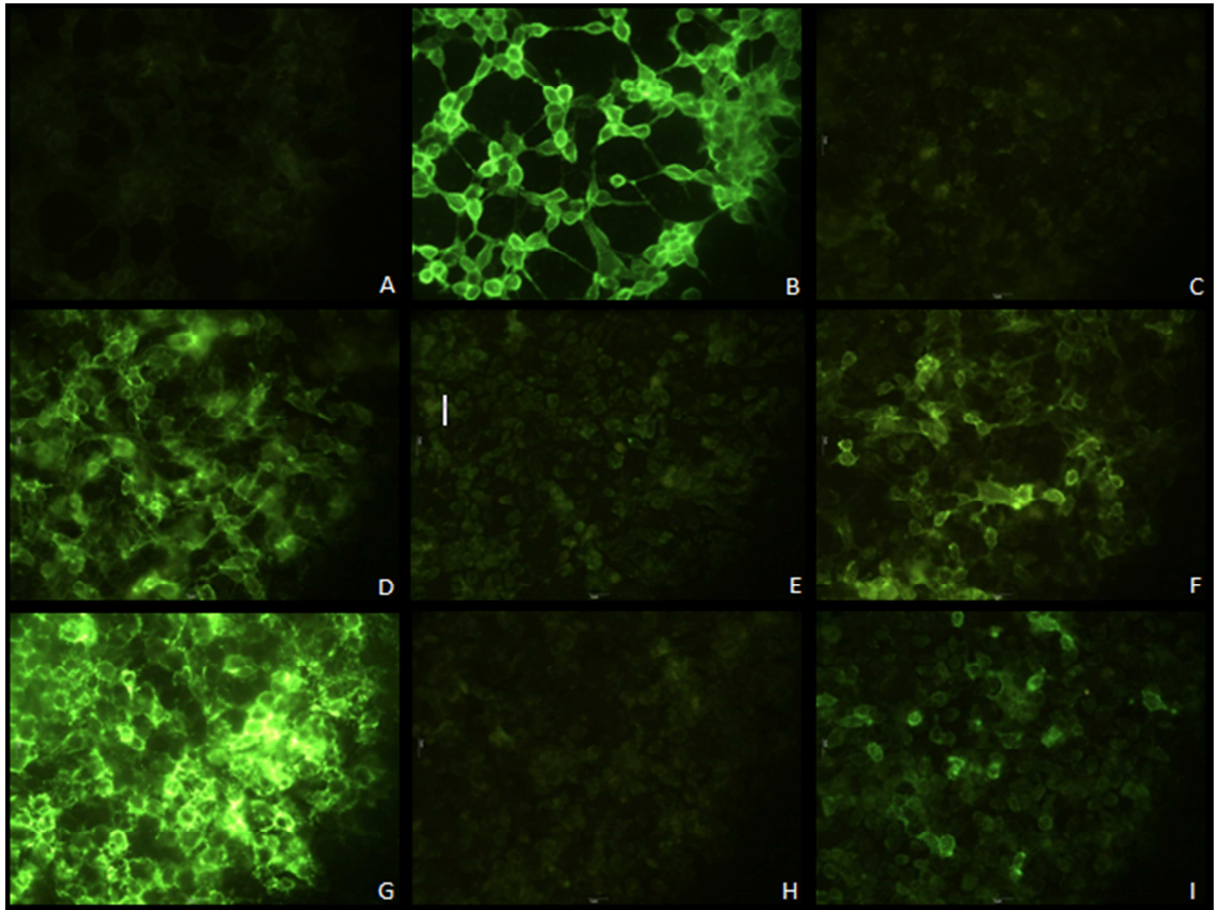


Figura 3.5 Imagens de imunofluorescência de células transfectadas com plasmídeos de expressão recombinantes. (A) Células HEK 293T, (B) células HEK 293T infectadas com CHIKV, (C) células HEK 293T transfectadas com pLEXm, e (C, D, E, F, G, H, I) com pLCHIKS28, pLCHIKS45, pLCHIKS62, pLCHIKS67, pLCHIKS69 e pLCHIKS76, respectivamente (ampliação 400x). Observam-se diferentes intensidades na emissão de fluorescência sendo esta concentrada na periferia celular.

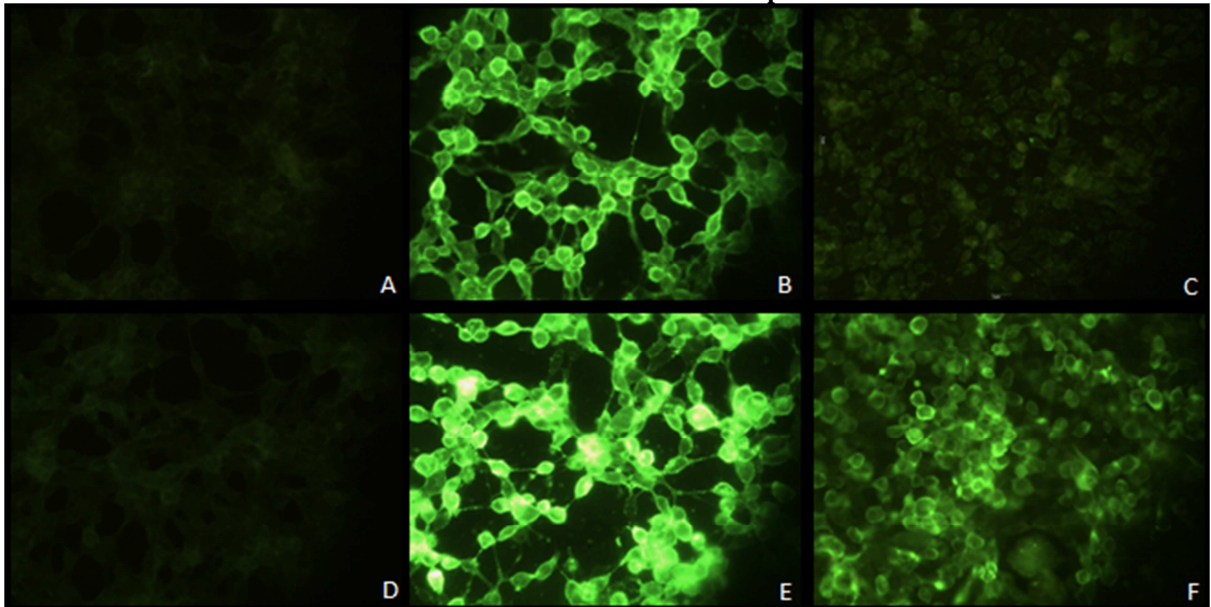


Figura 3.6 Imagens de imunofluorescência de células HEK 293T não permeabilizadas (A, B e C) e permeabilizadas (D, E e F) com detergente. (A e D) Células HEK 293T, (B e E) células HEK 293T infectadas com CHIKV, (C e F) células HEK 293T transfectadas com pLCHIKS45. Observa-se um aumento na emissão de fluorescência nas células permeabilizadas infectadas com vírus e transfectadas com pLCHIKS45, relativamente a preparações correspondentes não permeabilizadas. (Ampliação 400x)

Nos ensaios de imunofluorescência (Figura 3.5) foram usadas como controlo positivo células HEK 293T infectadas com CHIKV e como controlo negativo as mesmas células transfectadas com o plasmídeo pLEXm e células não transfectadas. As células HEK 293T infectadas com CHIKV (Figura 3.5B) demonstraram emissão forte de fluorescência por quase todas as células que ainda permaneciam aderentes ao fim de 24 de infecção, sendo aquela aparentemente localizada na membrana citoplasmática. Quanto aos controlos negativos, células HEK 293T (Figura 3.5A) e células HEK 293T transfectadas com pLEXm (Figura 3.5C) demonstraram uma emissão de fluorescência basal difusa quase imperceptível, semelhante em ambos os casos. As células transfectadas com os plasmídeos recombinantes pLCHIKS 28, 62, 67 e 76 apresentaram um padrão de fluorescência semelhante às células infectadas com CHIKV, com emissão de fluorescência na membrana citoplasmática mas variando essencialmente a sua intensidade. A intensidade de fluorescência foi maior nas células transfectadas com pLCHIKS67 (Figura 3.5G), diminuindo sucessivamente nas células transfectadas com pLCHIKS28 (Figura 3.5D), pLCHIKS62 (Figura 3.5F) e pLCHIKS76 (Figura 3.5I). As células transfectadas com pLCHIKS45 (Figura 3.5E) e pLCHIKS69 (Figura 3.5H) apresentaram uma fluorescência de fundo semelhante aos controlos negativos. Nas células transfectadas com pLCHIKS67 observou-se uma emissão de fluorescência com intensidade semelhante ou mesmo superior à das células HEK 293T infectadas com CHIKV, devido à ausência do descolamento provocado pelo efeito citopático da infecção viral.

Com o objectivo de analisar uma possível expressão de proteínas virais intracelulares, para as células HEK 293T transfectadas com pLCHIKS45, uma vez que havia resultados preliminares de *Western blotting* sugestivos da síntese de antígenos virais, foi efectuado um passo adicional de permeabilização das membranas com o detergente *Triton® X100*. No controlo negativo (células HEK 293T), observou-se ausência de fluorescência, tanto na preparação não permeabilizada (Figura 3.6A) como na preparação permeabilizada (Figura 3.6D). Porém, no controlo positivo (células HEK 293T infectadas com CHIKV) permeabilizado (Figura 3.6E), observou-se maior intensidade de fluorescência e localização mais uniforme (membrana e interior da célula) relativamente às células infectadas não permeabilizadas (Figura 3.6B). As células transfectadas com pLCHIKS45 apresentaram resultados diferentes com e sem permeabilização (Figura 3.6C e Figura 3.6F, respectivamente). Enquanto as células não permeabilizadas apresentavam uma quase ausência de fluorescência, quando da permeabilização a emissão de fluorescência aumentou consideravelmente apresentando um padrão semelhante ao controlo positivo, ainda que

substancialmente menos intenso. Este resultado indica a expressão de antígenos virais nas células transfectadas com pLCHIKS45, embora estes não sejam transportados e expostos na membrana citoplasmática.

3.4 Expressão de proteínas virais em células transfectadas

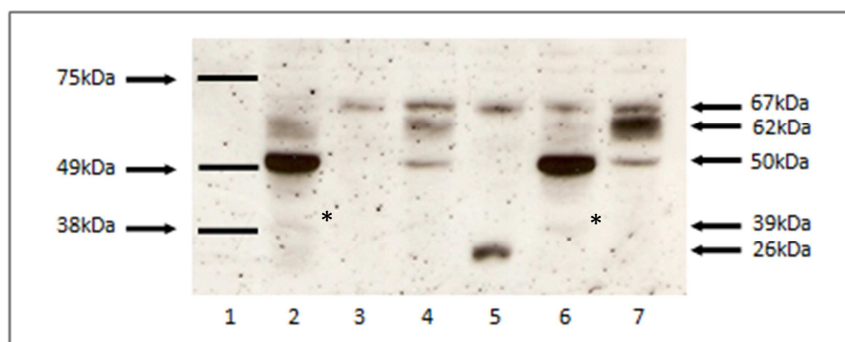


Figura 3.7. Perfil electroforético de células HEK 293T infectadas com CHIKV (2) e transfectadas com pLEXm (3), pLCHIKS28 (4), pLCHIKS45 (5), pLCHIKS67 (6) e pLCHIKS76 (7). Observam um perfil de bandas típico nas células infectadas com CHIKV, bandas de 62kDa, 50kDa, ocorrendo variantes destas nos diferentes clones. Marcador de pesos moleculares (1) *ProSieve® Color Protein Marker #50552*.

Para a identificação dos antígenos de CHIKV expressos quando da transfecção com os diferentes vectores de expressão, procedeu-se à análise por *Western blotting* das proteínas presentes em extractos celulares totais de células HEK 293T não transfectadas, transfectadas com os diferentes vectores de expressão, selvagem e recombinantes, e infectadas com CHIKV (Figura 3.7). Após corrida das amostras em géis de SDS-PAGE em condições desnaturantes, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi bloqueada durante a noite, incubada com anticorpo primário e conjugado e revelada com o sistema ECL. O protocolo de *Western blotting* foi optimizado quanto à concentração de leite em pó desnatado do tampão de bloqueio, diluição do soro policlonal anti-CHIKV e duração da exposição da membrana aos anticorpos, tendo como objectivo potenciar a sensibilidade e especificidade da técnica. Obtiveram-se os melhores resultados fazendo o bloqueio durante a noite com tampão TBST e 10% leite em pó desnatado e usando diluições de 1:1000 (1h30min) e 1:160000 (1h00) de anticorpo primário e conjugado, respectivamente.

Nos extractos celulares totais de células infectadas com CHIKV (controlo positivo), foram detectadas duas bandas correspondentes a proteínas virais, uma banda com uma massa molecular estimada de cerca de 62 kDa com sinal menos intenso, possivelmente correspondente ao precursor pE2, e outra banda com menor massa molecular (aproximadamente 50 kDa) mas sinal mais forte, que deverá corresponder às glicoproteínas virais E1 e E2, as quais apresentam comigração em géis de separação uniformes. Nos extractos correspondentes às células transfectadas com o plasmídeo selvagem (Figura 3.7B) e células não infectadas (dados não apresentados), não foram detectados estes antígenos virais. As células HEK 293T transfectadas com os plasmídeos pLCHIKS28, pLCHIKS62 (não apresentado), pLCHIKS67 e pLCHIKS76 demonstraram um padrão de proteínas semelhante ao controlo positivo, podendo-se identificar duas bandas específicas de aproximadamente 50 kDa e 62 kDa, embora estas surjam com diferente intensidade. As células transfectadas com pLCHIKS67 apresentaram o padrão de bandas com maior semelhança com as células infectadas com CHIKV, caracterizado por uma elevada intensidade da banda correspondente às glicoproteínas virais individuais (50 kDa), e reduzida intensidade na banda de massa superior referente ao precursor pE2 (62 kDa). Foi ainda possível detectar uma banda muito fraca, mas única para estas duas amostras, com uma massa molecular de cerca de 39 KDa (indicada com asterisco na Figura 3.7) e que poderá corresponder à proteína da cápside. Comparativamente, o padrão de *Western blotting* das células transfectadas com pLCHIKS28 e pLCHIKS76 apresentou uma inversão na intensidade das bandas, possuindo a banda de 62 kDa (pE2) a mesma intensidade ou intensidade superior à banda de 50 kDa das glicoproteínas individuais processadas. Relativamente às células transfectadas com pLCHIKS62, apenas com grande tempo de exposição foram visualizadas as duas bandas típicas do perfil do controlo positivo (dados não apresentados). Nas células transfectadas com o plasmídeo pLCHIKS69, não foram observadas quaisquer bandas comuns às células infectadas com CHIKV, mesmo com um tempo de exposição prolongado. O padrão de bandas observado na amostra referente às células transfectadas com pLCHIKS45 revelou-se diferente do controlo positivo e de quaisquer células transfectadas com outros plasmídeos. Apenas se visualizou uma única banda intensa de cerca de 26 kDa, estando ausentes as duas bandas expectáveis de antígenos virais.

3.5 Produção de VLPs de CHIKV

No sentido de tentar avaliar a formação de VLPs nas células transfectadas com os diferentes plasmídeos de expressão recombinantes, procedeu-se à precipitação com PEG 8000 dos diferentes sobrenadantes de cultura clarificados, obtidos quando da preparação dos extractos celulares totais, e subsequente análise por *Western blotting* das proteínas presentes nos precipitados (Figura 3.8). Na pista correspondente ao precipitado do sobrenadante de células infectadas com CHIKV foi detectada uma única banda específica de aproximadamente 50 kDa. Esta deverá corresponder às glicoproteínas virais E1 e E2 presentes no invólucro dos viriões produzidos nas células infectadas. Esta banda foi também detectada no precipitado do sobrenadante das células transfectadas com pLCHIKS67 e, curiosamente, com a mesma intensidade, sugerindo fortemente a formação de VLPs nestas células transfectadas. Esta banda não está presente nas células não infectadas e nas células transfectadas com pLEXm ou com qualquer um dos restantes plasmídeos de expressão recombinantes. Uma banda com o peso molecular de aproximadamente de 67 kDa foi identificada em todas as amostras, extractos celulares totais e precipitados de sobrenadantes, de células infectadas e não infectadas e células transfectadas com o plasmídeo selvagem e com os plasmídeos pLCHIKS recombinantes, devendo corresponder a um antígeno celular.

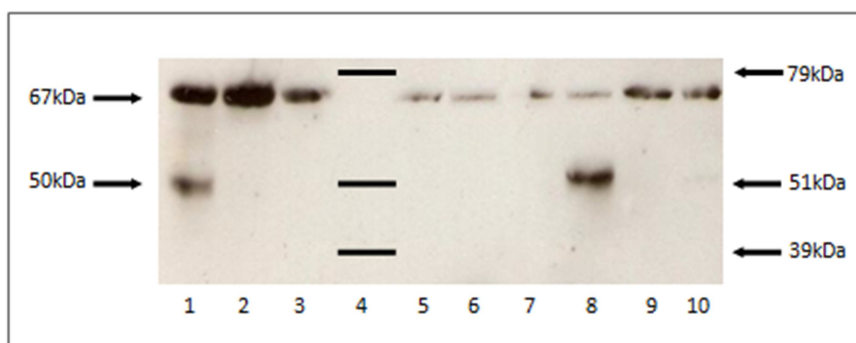


Figura 3.8. Perfil electroforético de células HEK 293T infectadas com CHIKV (1), células HEK 293T (2) e células transfectadas com pLEXm (3), pLCHIKS28 (5), pLCHIKS45 (6), pLCHIKS62 (7), pLCHIKS67 (8), pLCHIKS69 (9) e pLCHIKS76 (10). Observa-se apenas uma banda viral de cerca de 49kDa nas células infectadas com CHIKV e células transfectadas com pLCHIKS67. Marcador de pesos moleculares (4) *ProSieve® Color Protein Marker #50550*.

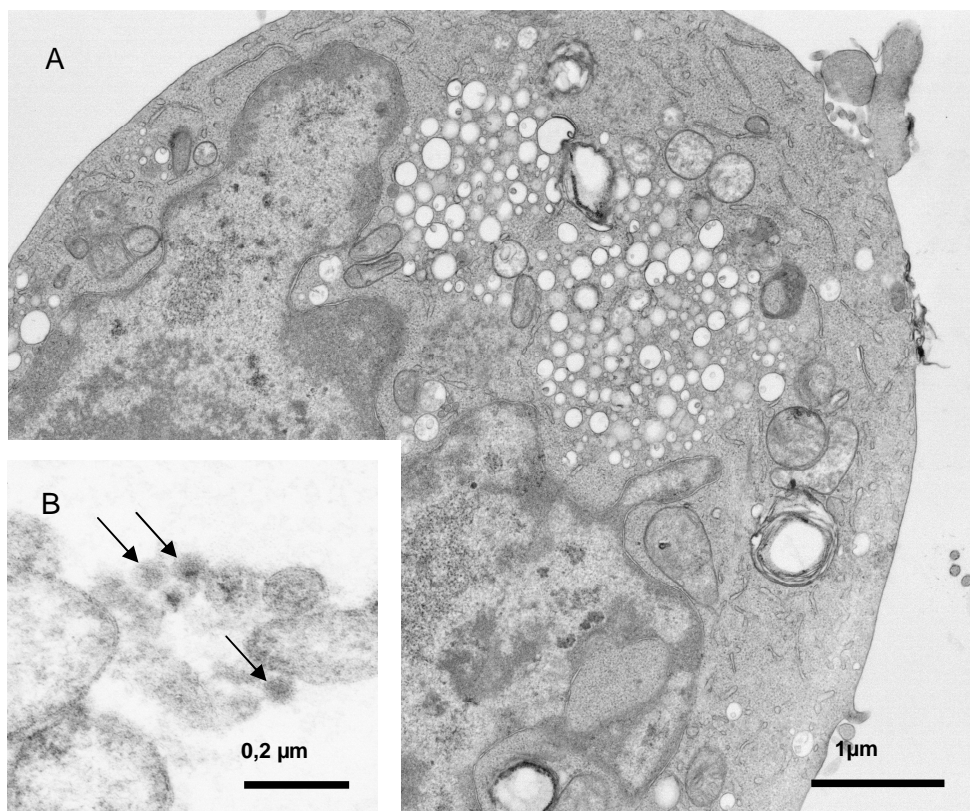


Figura 3.9 Células HEK 293T infectadas com CHIKV 24 horas pós infecção. A) Arranjo de vesículas membranares no citoplasma das células infectadas. B) partículas extracelulares de CHIKV (setas).

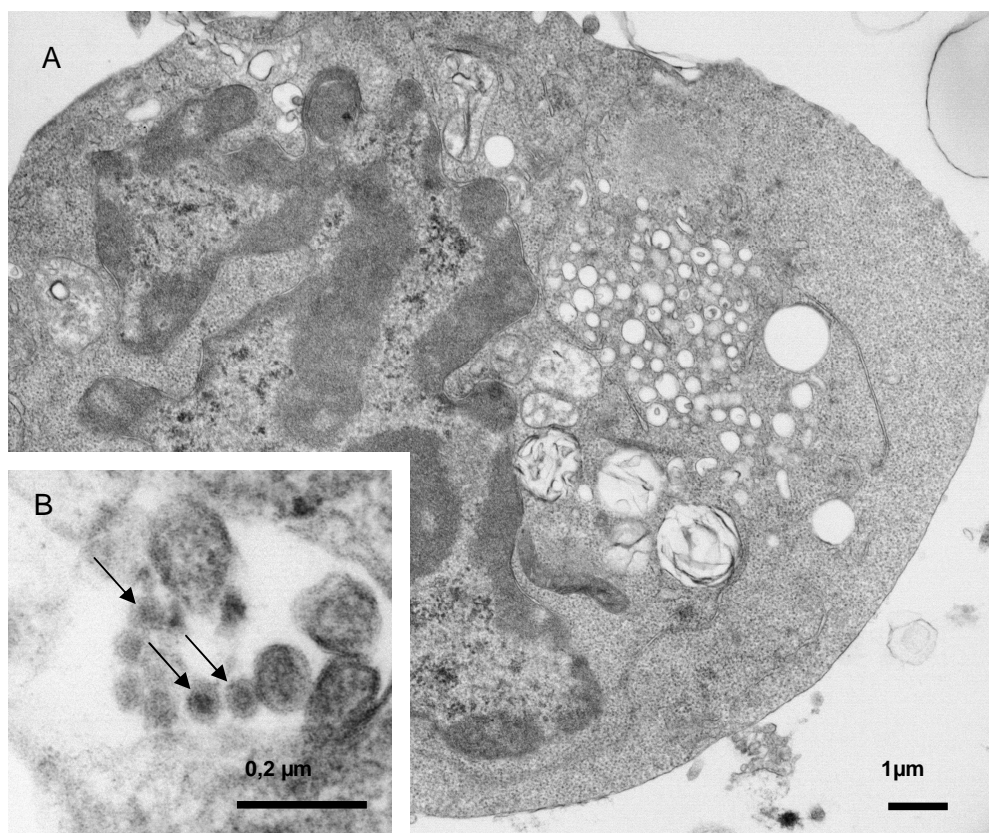


Figura 3.10 Células HEK 293T transfectadas com o vector de expressão recombinante pLCHIKS67 às 48 horas pós transfecção. A) Arranjo de vesículas membranares no citoplasma das células transfectadas. B) VLPs extracelulares de CHIKV (setas).

Face ao forte indício da presença de VLPs no sobrenadante das células transfectadas com pLCHIKS67, procedeu-se à análise por microscopia electrónica de preparações destas células e ainda de células HEK 293T não infectadas e infectadas com CHIKV, numa tentativa de confirmar a produção de VLPs naquelas células transfectadas.

A Figura 3.9 mostra fotografias de secções ultrafinas de células infectadas com CHIKV processadas para microscopia electrónica de transmissão usando procedimentos convencionais de fixação, embebição e coloração com acetato de uranilo/citrato de chumbo. É possível observar partículas virais extracelulares (indicadas por setas na Figura 3.9B) com invólucro e nucleóide interno denso aos electrões e com as dimensões esperadas para o CHIKV (cerca de 65 nm de diâmetro). Salienta-se ainda o extenso arranjo de vesículas membranares citoplasmáticas induzidas por CHIKV (Figura 3.9A) e ausentes nas células não infectadas (dados não apresentados).

Em preparações correspondentes de células transfectadas com pLCHIKS67 observou-se partículas extracelulares (indicadas pelas setas na Figura 3.10B) idênticas, em termos de morfologia e dimensões, às partículas virais observadas na Figura 3.9B. Estas partículas deverão corresponder a VLPs de CHIKV formadas pela expressão da sequência codificante da poliproteína estrutural inserida no vector pLCHIKS67. Curiosamente, observa-se também nas células transfectadas o rearranjo de vesículas membranares citoplasmáticas (Figura 3.10A) observado nas células infectadas e que poderão estar associadas à síntese das proteínas virais estruturais.

4.

Discussão

Cerca de 80 anos após a introdução da primeira vacina contra um arbovírus, o vírus da Febre amarela, a vacinação continua a ser o método mais eficaz de prevenção das arboviroses e de muitos outros agentes infecciosos. No caso do CHIKV, apesar de várias tentativas de desenvolvimento de vacinas, não existe uma vacina aprovada que seja segura e eficaz. Se por um lado as abordagens clássicas de vacinas de vírus atenuado e de vírus inativado desenvolvidas apresentam problemas de segurança (Edelman *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1971; Wang *et al.*, 2008), por outro lado abordagens mais recentes como as vacinas de DNA (Muthumani *et al.*, 2008; Mallilankaraman *et al.*, 2011), são dispendiosas e requerem a administração de múltiplas doses. Recentemente, foi desenvolvida uma vacina de VLPs para

CHIKV capaz de conferir protecção num modelo símio de infecção por este vírus (Akahata *et al.*, 2010). As vacinas de VLPS, pelo facto de não serem infecciosas e de simularem partículas virais autênticas, são seguras e induzem elevados títulos de anticorpos neutralizantes e consequentemente constituem uma boa vacina alternativa. Porém, a tecnologia usada por Akahata e colaboradores para a obtenção de VLPs de CHIKV, baseada na transfecção de células humanas com vectores de expressão, apresenta elevados custos de produção. O sistema vector de expressão de baculovírus (BEVs)/células de insecto(IC) permite a expressão de quantidades elevadas de proteína recombinante e tem-se revelado particularmente útil para a produção de VLPs (revisto em Vicente *et al.*, 2011). Estas características de BEVS/ICA aliadas ao facto de o CHIKV se replicar em células de insecto, e desta forma as suas glicoproteínas poderem ser processadas e modificadas de forma semelhante ao que acontece na infecção natural, levou-nos a considerar este sistema como uma boa alternativa para a produção de VLPs de CHIKV. Uma vez que a sequência codificadora da poliproteína estrutural do CHIKV tem cerca de 3,7 kb, existe a possibilidade de introdução de codões de paragem espúrios quando da sua amplificação por RT-PCR e consequente expressão de poliproteínas truncadas. No sentido de tentar evitar a produção de baculovírus recombinantes incapazes de produzir VLPs, decidimos construir previamente um vector de expressão plasmídico recombinante que funcionasse como fonte de genes das proteínas estruturais de CHIKV e ao mesmo tempo permitisse testar a sua capacidade de originar VLPs quando introduzido em células eucarióticas.

O plasmídeo seleccionado para a expressão da poliproteína estrutural de CHIKV foi o pLEXm (Aricescu *et al.*, 2006). Este vector (Figura 2.1) possui uma origem de replicação de pBR322, o gene de resistência à ampicilina, um *enhancer* de citomegalovírus, o promotor da β -actina de galinha, local de clonagem múltipla e o intrão e sinal de poliadenilação da β -globina de coelho, tendo resultado de um esforço para obter um plasmídeo de elevado número de cópias, com um promotor muito forte para células de mamífero e suficientemente pequeno para permitir a clonagem de sequências relativamente longas. Quando da amplificação por RT-PCR da ORF estrutural do CHIKV foram desenhados *primers* específicos para inserir locais de restrição SacI 5' e NotI 3' nos extremos da sequência amplificada, de modo a permitir a sua inserção no vector de forma dirigida. Desenharam-se dois tipos de *primers* 5', um com a sequência da estirpe viral S27, outro com esta sequência modificada de forma a ter uma sequência Kozak optimizada (GCCACCATGG) e assim aumentar a eficácia da tradução. Apesar de múltiplas variações nas condições de amplificação, não foi possível obter produto

de PCR com este último *primer*. A clonagem em pLEXm deu origem a vários transformantes de *E. coli* com inserto do tamanho correcto, cuja sequência 5' na região de ligação ao vector foi confirmada por sequenciação. Seis clones recombinantes foram posteriormente usados na transfecção de células HEK 293T usando polietilenimina (PEI) como reagente de transfecção. PEI é um polímero catiónico estável que se associa ao DNA carregado negativamente, estes complexos ligam-se à superfície da célula e são endocitados (Sonawane *et al.*, 2003). A utilização de PEI com várias linhas celulares resultou em eficiências de transfecção de 40-90% (Ehrhardt *et al.*, 2006). A transfecção com um plasmídeo repórter expressando a proteínas fluorescente EGFP permitiu-nos demonstrar uma elevada taxa de transfecção (Figura 3.4) nas condições usadas. À semelhança de outros autores, confirmámos que a transfecção com PEI é uma forma extremamente económica (alguns centimos) de conseguir eficiências de transfecção de células HEK 293T tão ou mais elevadas que outros reagentes comerciais muito onerosos (Ehrhardt *et al.*, 2006; Aricescu *et al.*, 2006).

Nas células infectadas com CHIKV, as proteínas estruturais são expressas a partir do RNA viral subgenómico como uma poliproteína C-pE2-6K-E1 que é processada proteoliticamente pela ordem indicada (Figura 1.3). A proteína da cápside (C, 30-36 kDa) liberta-se por autoproteólise da restante poliproteína a qual é translocada para o RE e que vai dar origem às glicoproteínas pE2 (precursora de E2, ≈62 kDa) e E1 (≈50 kDa) por corte de 6K por sinalases celulares. pE2 é posteriormente cortada pela furina e dá origem a E3 (≈11 kDa) e a E2 (≈50 kDa). As células transfectadas com os diferentes vectores de expressão recombinantes pLCHIKS mostraram padrões diversos de expressão dos antígenos de CHIKV quando analisadas por *Western blotting* (WB), usando um soro policlonal anti-CHIKV induzido em murganhos inoculados com sobrenadante clarificado de culturas infectadas (Figura 3.7). À semelhança das células infectadas, quatro vectores (pLCHIKS28, 62, 67 e 72) expressaram duas proteínas cuja mobilidade é concordante com pE2 e E1/E2. De facto, assume-se que E1 e E2 são expressas, apesar da banda única, devido à sua comigração. Apenas a utilização de um soros ou anticorpos monoclonais específicos para cada uma delas poderia identificá-las inequivocamente. Relativamente à proteína da cápside que deverá estar presente em quantidades equimolares, devido à sua fraca antigenicidade, dificilmente é visualizada em WB em que usa na detecção soro policlonal anti-CHIKV, sendo geralmente usado um anticorpo monoclonal específico para esta proteína (Akahata *et al.*, 2010; Sourisseau *et al.*, 2007). De facto, nas células infectadas e nas células transfectadas com pLCHIKS67 observa-se uma banda muito fraca com uma massa molecular de

aproximadamente 39 kDa que poderá corresponder à proteína da cápside (Simizu *et al.*, 1984; Sourisseau *et al.*, 2007). A marcação radioactiva de proteínas (*e.g.* com ³⁵S-metionina) e fluorografia, também poderia originar um padrão mais preciso das proteínas virais sintetizadas.

Apesar do padrão 62 kDa/50 kDa comum, a intensidade das bandas é distinta para os diferentes vectores. pLCHIKS67 é o único que demonstra bandas com intensidade idêntica às das células infectadas com CHIKV e a forte intensidade da banda de 50 kDa comparativamente com a de 62 kDa sugere uma eficiência de expressão e processamento de pE2 semelhante nas duas situações. Para pLCHIKS28, 62 (dados não apresentados) e 76 as bandas de 62 kDa e 50 kDa são relativamente fracas e em quantidades equimolares (pLCHIKS 28 e 62) ou com maior intensidade de 62 kDa no caso de pLCHIKS76. Uma vez que as células foram transfectadas paralelamente com a mesma quantidade de DNA dos vários vectores de expressão e de acordo com o mesmo procedimento, a diferença quantitativa da expressão poderá reflectir menores taxas de tradução, pouco prováveis uma vez que a sequência nucleotídica na região 5' dos transcritos é idêntica de acordo com os dados de sequenciação. O enrolamento e modificação correctos das proteínas sintetizadas em associação com o retículo endoplasmático são essenciais para que não sejam degradadas (Goldberg, 2003). As glicoproteínas dos alfavírus estão sujeitas a um complexo rearranjo conformacional e modificação durante a tradução, dimerização e transporte até à superfície celular (Strauss e Strauss, 1994; Garoff *et al.*, 2004; Jose *et al.*, 2009). Mutações que conduzam a substituições de aminoácidos relacionados com a estrutura secundária (*e.g.* alteração dos resíduos de cisteína) ou com locais de modificação (*e.g.* glicosilação) poderão resultar na degradação destas proteínas. Podemos ainda considerar que a banda de 50 kDa corresponda a E1 e que pE2 não seja processado pela furina devido a uma mutação na sequência de corte por esta protease. Estas mutações, particularmente devido ao tamanho da sequência codificadora amplificada, podem ser introduzidas durante o PCR e a forma mais directa de esclarecer esta questão será a sequenciação. De notar que a intensidade da fluorescência observada quando dos ensaios preliminares de imunofluorescência nas células transfectadas com estes quatro vectores recombinantes e infectadas (Figura 3.5) é concordante com os resultados de WB.

Para as células transfectadas com pLCHIKS45 foi observada uma intensidade de fluorescência muito baixa que, numa primeira análise, se poderia considerar de fundo e que nos levou a considerar este vector como não expressando antígenos virais. Porém, quando da

análise por WB identificámos uma banda proteica específica com uma massa molecular estimada de 26 kDa. Esta espécie proteica deverá corresponder a uma forma truncada da poliproteína viral, sendo provável que tenha ocorrido uma mutação *nonsense* na metade amina de E2 que impede a síntese da restante poliproteína e afecta o transporte da proteína truncada sintetizada até à superfície celular. Para demonstrar o carácter intracelular desta proteína procedemos à permeabilização com detergente das células transfectadas, antes da incubação com o soro anti-CHIKV, e verificámos o aparecimento de fluorescência relativamente intensa (Figura 3.6). De facto, a proteína de 26 kDa deverá corresponder a um fragmento estável (metade amina) de pE2 ou de E2, uma vez que é reconhecida pelo soro imune, que não é transportado para a membrana citoplasmática devido a não possuir a região transmembranar de ancoragem presente perto do extremo carboxilo da proteína completa.

A precipitação com polietilenoglicol (PEG) é uma técnica há muito usada para concentração de partículas virais por ser rápida, pouco dispendiosa e não destrutiva (Philipson *et al.*, 1960; Lewis e Metcalf, 1988). Como primeira abordagem usámo-la para concentrar eventuais VLPs presentes nos sobrenadantes de culturas transfectadas. A análise por WB dos precipitados obtidos (Figura 3.8) revelou a presença da banda de 50 kDa, correspondente às glicoproteínas E1 e E2 processadas e maioritariamente presentes nas partículas virais maduras, nas células transfectadas com o vector pLCHIKS67 e também observada no sobrenadante das células infectadas com CHIKV. Uma banda de 67 kDa foi também detectada nestes precipitados, assim como em grande quantidade em precipitados do sobrenadante de cultura de células não infectadas ou de células transfectadas com pLEXm e ainda nos extractos celulares totais. A sua massa molecular e o facto do soro anti-CHIKV ter sido obtido por imunização com um sobrenadante de cultura infectada e não com vírus purificado, leva-nos a pôr a hipótese desta banda corresponder à albumina sérica bovina (66,5 kDa) presente no soro usado para suplementar o meio de cultura.

Para confirmar a formação de VLPs e para eliminar a hipótese de se estar a precipitar apenas oligómeros de E1/E2 libertados no meio extracelular, procedemos à análise por microscopia electrónica de transmissão de células transfectadas com pLCHIKS67. Nestas preparações, foram visualizadas partículas extracelulares com a mesma dimensão e morfologicamente semelhantes às partículas virais presentes nas preparações de células infectadas com CHIKV indicando que o vector pLCHIKS67 permite a expressão de VLPs do CHIKV quando introduzido em células HEK 293T (Figura 3.10). É curioso salientar que a primeira vez que se produziu VLPs para um alfavírus foi muito recentemente para CHIKV

(Akahata *et al.*, 2010). Isto deve-se provavelmente ao facto do modelo de morfogénese da nucleocápside, correntemente aceite para os alfavírus, implicar o reconhecimento e interacção específica entre o RNA genómico e a proteína da cápside virais como evento de nucleação necessário à oligomerização daquela proteína (Strauss e Strauss, 1994; Garoff *et al.*, 2004; Warrier *et al.*, 2008; José *et al.*, 2009). No entanto, Tellinghusen e colaboradores (1999) conseguiram formar nucleocápsides *in vitro* partindo de proteína da cápside recombinante purificada de vírus Sindbis e Ross River e de ácido nucleico de cadeia simples. Estes autores testaram a adição de RNA viral, tRNA, oligonucleótidos de DNA de cadeia simples e DNA de cadeia dupla à mistura de montagem da nucleocápside, tendo verificado a necessidade absoluta de ácido nucleico e ainda que o RNA viral era preferencialmente seleccionado, mas que outros substratos de montagem podiam ser usados desde que possuíssem cadeia simples. Será interessante estudar a presença ou não de ácido nucleico nas VLPs obtidas e, em caso afirmativo, quais os ácidos nucleicos encapsidados. A sequência de encapsidação varia entre os alfavírus (Frolova *et al.*, 1997) sendo desconhecida para o CHIKV. O sistema de expressão de VLPs poderá ser usado para identificar esta sequência.

Nas células transfectadas com pLCHIKS67 (Figura 3.10), à semelhança das células infectadas com CHIKV (Figura 3.9), foram observados, por microscopia electrónica, extensos arranjos de vesículas membranares com dimensões entre 100 e 400 nm de diâmetro e ausentes de células não infectadas e transfectadas com vector pLEXm selvagem (dados não apresentados). Estudos de ME realizados com outros alfavírus permitiram evidenciar dois tipos de arranjos membranares induzidos durante a infecção e que foram designados vacúolos citopáticos do tipo I e do tipo II (CPV-I e CPV-II) (Friedman *et al.*, 1972; Grimley *et al.*, 1972). CPV-I derivam de endossomas e lisossomas modificados, surgem nas fases iniciais da infecção e estão envolvidos na biogénese dos complexos de replicação do RNA viral (Kujala *et al.*, 2001), enquanto CPV-II derivam da rede do *trans*-Golgi, surgem na fase tardia e são os principais compartimentos membranares contendo as glicoproteínas virais E1/E2 (Griffiths *et al.*, 1983). Para o vírus Semliki Forest (SFV), foi demonstrado que CPV-II estão envolvidos no transporte de E1/E2 e na gemulação viral na membrana citoplasmática (Soonsawad *et al.*, 2010; Garoff *et al.*, 1994). Pensamos que os arranjos de vesículas observados, tanto nas células infectadas por CHIKV (24 h.p.i.) como nas células transfectadas (48 h.p.t) que expressam as proteínas estruturais de CHIKV, possam corresponder aos CPV-II de SFV atendendo à localização celular e fase da infecção em que são observados e ainda às suas dimensões que são da mesma ordem de grandeza. No entanto, a morfologia de CPV-II de

SFV é distinta devido à presença de estruturas tubulares dentro dos vacúolos e ao revestimento com partículas densas aos electrões na superfície exterior (Soonsawad *et al.*, 2010). A reorganização das membranas intracelulares com formação de vacúolos citopáticos foi igualmente observada por ME em células BHK-21 infectadas com CHIKV às 24 h.p.i. (Saraswathy *et al.*, 2010). Será interessante estudar a associação das glicoproteínas de CHIKV a estes arranjos membranares (*e.g.* por imunoelectromicroscopia) tanto nas células infectadas como nas células transfectadas, uma vez que até agora não foram descritas estas estruturas nas células transfectadas expressando apenas proteínas estruturais de alfavírus nem quais as proteínas virais responsáveis pela sua indução.

Concluindo, construímos um vector plasmídico recombinante, pLCHIKS67, tendo inserido a jusante do promotor da β -actina de galinha a sequência codificadora da poliproteína estrutural do CHIKV. Este vector, quando transfectado em células HEK 293T, induz a expressão da poliproteína estrutural viral, seu processamento proteolítico, modificação e transporte intracelular correctos, gerando VLPs que são libertadas para o meio extracelular. Estas são idênticas, em termos de dimensão e morfologia, às partículas virais nativas produzidas em células infectas por CHIKV, conforme demonstrado por microscopia electrónica. Este vector recombinante poderá ser usado, como fonte de DNA codificador das proteínas estruturais de CHIKV, para obtenção de baculovírus recombinantes e produção de VLPs em células de insecto.

Bibliografia

- Akahata, W. Y. (2010). A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat. Med.* , 16, 334-338.
- Angelini, R. F. (2007). An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill* , 12, pii=3260.
- Anónimo. Outbreak and spread of Chikungunya. (2007). *Wkly. Epidemiol. Rec.* , 82, 409-415.
- Apandi, Y. N. (2009). The first isolation of Chikungunya virus from nonhuman primates in Malaysia. *J. Gen. Mol. Virol.* , 1, 35-39.
- Arankalle, V. S. (2007). Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J. Gen. Virol.* , 88, 1967-1976.
- Aricescu, A. L. (2006). A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Cryst.* , D62, 1243-1250.
- Bernard, E. S. (2010). Endocytosis of Chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLOS* , 5, 1-11.
- Bilsel, P. T. (1988). RNA genome stability of Toscana virus during serial transovarial transmission in the sandfly *Phlebotomus perniciosus*. *Virus Res.* , 11, 87-94.
- Burt, F. R. (2011). Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet* , Epub ahead of print.
- Calisher, C. K. (1988). Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In C. Press (Ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* (Vol. I, pp. 19-57). Boca Raton, FL: T. P. Monath.
- Carey, D. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J. Hist. Med Allied Sci* , 26, 243-262.
- Cheng, R. K. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell* , 80, 621-630.
- Das, T. J.-B.-P.-Y. (2010). Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Elsevier* , 91, 121-129.
- De Curtis, I. S. (1988). Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 85, 8052-8056.

- de Groot, R. R. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 88, 8967-8971.
- De Lamballerie, X. (2006). CuraChick: a trial of the efficacy and safety of chloroquine as therapeutic treatment of Chikungunya disease. <http://druglib.com/trial/13/NCT391313.html> .
- Dé, I. F.-H. (2003). Functional analysis of nsP3 phosphoprotein mutants of Sindbis virus. *J. Virol.* , 77, 13106-13116.
- Delatte, H. D. (2009). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Diallo, M. T.-L. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 60, 281-286.
- Durocher, Y. P. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growth human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30, E9.
- Dwibedi, B. M. (2009). Emergence of Chikungunya virus infection in Orissa, India. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Edelman, R. T. (2000). Phase II safety and immunogenicity study of live Chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 62, 681-685.
- Ehrhardt, C. S. (2006). Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction* , 6, 179-184.
- Enserink, M. (2008). A mosquito goes global. *Science* , 320, 864-866.
- Fata, C. S. (2002). Modification of Asn374 of nsP1 suppresses a Sindbis virus nsP4 minus-strand polymerase mutant. *J. Virol.* , 76, 8641-8649.
- Forsell, K. G. (1996). Preformed cytoplasmic nucleocapsids are not necessary for alphavirus budding. *EMBO J* , 15, 6495-6505.
- Frolov, I. H. (2001). Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* , 7, 1638-1651.
- Frolova, E. F. (1997). Packaging signals in alphaviruses. *J. Virol.* , 71, 248-258.
- Gaedigk-Nitschko, K. S. (1990). The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. *Virology* , 175, 274-281.
- Galbraith, S. S. (2006). Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *J. Gen. Virol.* , 87, 937-947.
- Garoff, H. H. (1990). The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *J. Cell Biol.* , 111, 867-876.

- Garoff, H. S. (2004). Budding of alphaviruses. *Virus Res.* , 106, 103-116.
- Garoff, H. W. (1994). Assembly and entry mechanisms of Semliki Forest virus. *Arch. Virol. Suppl.* , 9, 329-338.
- Gérardin, P. B.-S. (2008). Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLOS* , 5, 413-423.
- Goldberg, A. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* , 426, 895-899.
- Gorbalenya, A. K. (1988). One more conserved sequence motif in helicases. *Nucleic Acids Res.* , 16, 7734.
- Gould, E. C. (2010). Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res.* , 87, 111-124.
- Gould, E. G. (2010). First cases of autochthonous Dengue fever and Chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinic Microbiol. and Infect.* , 12, 1702-1704.
- Grakoui, A. L. (1989). A cis-acting mutation in the Sindbis virus junction region which affects subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* , 63, 5216-5227.
- Griffiths, G. Q. (1983). Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus. *J. Cell Biol.* , 96, 835-850.
- Halstead, S. (2009). Chikungunya. In R. C.-H. Feigin, *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. (pp. 2314-2319). Philadelphia: Saunders.
- Hammon, W. S. (1964). Virological findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (Dengue) in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 13, 629-641.
- Harley, D. S. (2001). Ross river virus transmission, infection and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* , 14, 909-932.
- Harley, D. S. (2001). Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* , 14, 909-932.
- Harrison, V. E. (1971). Production and evaluation of a formalin killed Chikungunya vaccine. *J. Immunol.* , 107, 643-647.
- Hasebe, F. P. (2002). Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* , 67, 370-374.
- Her, Z. K. (2009). Chikungunya: a bending reality. *Microbes and Infection* , 11, 1165-1176.
- Higashi, N. M. (1967). Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells. *Virology* , 33, 55-69.

- Jain, M. R. (2008). Chikungunya: a review. *Trop. Doct.* , 38, 70-72.
- Jose, J. S. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* , 4, 837-856.
- Jupp, P. M. (1990). Aedes furcifer and other mosquitoes as vectors of Chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* , 6, 415-420.
- Khan, A. M. (2002). Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* , 83, 3075-3084.
- Kielian, M. (2010). An alphavirus puzzle solved. *Nature* , 468, 645-646.
- Kielian, M. C. (2000). Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. *Subcell. Biochem.* , 34, 409-455.
- Knudsen, A. (1995). Global distribution and continuing spread of Aedes albopictus. *Parassitologia* , 37, 91-97.
- Kuberski, T. R. (1977). A simple technique for the detection of Dengue antigen in mosquitoes by immuno-fluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 26, 533-537.
- Kujala, P. I. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J. Virol.* , 75, 3873-3884.
- Kumarasamy, V. P. (2006). Re-emergence oh Chikungunya virus in Malaysia. *Med. J. Malaysia* , 61, 221-225.
- Labadie K, L. T. (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* , 120, 894-906.
- Lam, S. K. (2001). Chikungunya infection - an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* , 32, 447-451.
- Laras, K. S. (2005). Tracking the re-emergence of epidemic Chikungunya virus in Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 99, 128-141.
- Lewis, G. M. (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* , 54, 1983-1988.
- Li, L. J. (2010). Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* , 468, 705-708.
- Ligon, B. L. (2006). Reemergence of an unusual disease: the Chikungunya epidemic. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* , 17, 99-104.
- Liljestrom, P. L. (1991). In vitro mutagenesis of a full-lenght cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J. Virol.* , 65, 4107-4113.

- Lumsden, W. (1955). An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-1953 II. General description and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 49, 33-57.
- Lusa, S. G. (1991). Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly. *Virology* , 185, 843-846.
- Malet, H. C. (2009). The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* , 83, 6534-6545.
- Mallilankaraman, K. S. (2011). A DNA vaccine against chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* , 5, e928.
- Mavalankar, D. S. (2007). Chikungunya epidemic in India: a major public health disaster. *Lancet. Infect. Dis.* , 7, 306-307.
- McCrae, A. H. (1971). Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 65, 152-168.
- Mckenzie, J. C. (2001). Emerging viral diseases of southeast Asia and the western Pacific. *Emerg. Infect. Dis.* , 7, 497-504.
- Melton, J. E. (2002). Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J. Biol. Chem.* , 277, 46923-46931.
- Metz, S. G. (2011). Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. *Virology Journal* , 8, 1-12.
- Mi, S. D. (1989). Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology* , 170, 385-391.
- Mohan, A. (2006). Chikungunya fever: clinical manifestations and management. *Indian J. Med. Res.* , 124, 471-474.
- Mukhopadhyay, S. Z. (2006). Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure* , 14, 63-73.
- Muthumani, K. L. (2008). Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine* , 26, 5128-5134.
- Neogi, D. B. (1995). Serosurvey of Chikungunya antibody in Calcutta metropolis. *J. Commun. Dis.* , 27, 19-22.
- Ng, L. H. (2010). Tracing the path of Chikungunya virus - evolution and adaptation. *Infect. Gen. Evol.* , 10, 876-885.

- OMS. (26 de Novembro de 2008). *Communicable Diseases Department*. Obtido em 11 de Agosto de 2010, de Laboratory Diagnosis of Chikungunya Fevers: http://www.searo.who.int/en/Section10/Section2246_12902.htm
- OMS. (2006). Outbreak news. Chikungunya and Dengue, south-west Indian Ocean. *Wkly. Epidemiol. Rec.* , 81, 106-108.
- Ozden S, H. M.-B. (2007). Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One* , 13, e527.
- Padbidri, V. G. (1979). Epidemiological investigations of Chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* , 23, 445-451.
- Parida, M. S. (2008). Rapid and real-time assays for detection and quantification of Chikungunya virus. *Future Virol.* , 3, 179-192.
- Pastorino, B. M.-T. (2004). Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of Congo: identification of a new central African strain. *J. Med. Virol.* , 74, 277-282.
- Pehrson, J. F. (1998). Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* , 26, 2837-2842.
- Peranen, J. R. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* , 64, 1888-1896.
- Perera, R. N. (2003). A heterologous coiled coil can substitute for helix I of the Sindbis virus capsid protein. *J. Virol.* , 77, 8345-8353.
- Perera, R. O. (2001). Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. *J. Virol.* , 75, 1-10.
- Perera, R. O. (1998). Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. *J. Virol.* , 75, 145-156.
- Pfeffer, M. K. (1998). The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology.* , 240, 100-108.
- Pfeffer, M. L. (2002). Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *J. Vet. Med.* , 49, 49-54.
- Philipson, L. A. (1960). The purification and concentration of viruses by aqueous polymerphase systems. *Virology* , 11, 553-571.
- Pialoux, G. G. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet. Infect. Dis.* , 7, 319-327.
- Plante, K. W. (2011). Novel Chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLOS* , 7, 1-11.

- Powers, A. B. (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.* , 75, 10118-10131.
- Powers, A. B. (2000). Re-emergance of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships,. *J. Gen. Virol.* , 81, 471-479.
- Powers, A. L. (2007). Changing patterns of Chikungunya virus: reemergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* , 88, 2363-2377.
- Quatresous, I. (2006). E-alert 27 January; Chikungunya outbreak in Reunion, a french overseas department. *Euro Surveill* , 11, E060202.1.
- Queyriaux, B. S. (2008). Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet. Infect. Dis.* , 8, 2-3.
- Ramful, D. C. (2007). Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr. Infect. Dis.* , 26, 811-815.
- Reiter, P. F. (2006). Aedes albopictus as an epidemic vector of Chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet. Infect. Dis.* , 6, 463-464.
- Robinson, M. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-1953. I. Clinical features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 49, 28-32.
- Ross, R. (1956). The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg.* , 54, 442-445.
- Salminen, A. W. (1992). Membrane fusion process of Semliki Forest virus. II: Cleavage-dependent reorganization of the spike protein complex controls virus entry. *J. Cell Biol.* , 116, 349-357.
- Saraswathy, T. T. Comparison of Chikungunya virus infectivity in baby hamster kidney (BHK-21) cell line and C6/36, na Aedes albopictus cell line using electron microscopy. *Annals of Microscopy* , 10, 36-43.
- Schuffenecker, L. I. (2006). Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* , 3, e263.
- Shirako, Y. S. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* , 68, 1874-1885.
- Simizu, B. Y. (1984). Structural proteins of Chikungunya virus. *J. Virol.* , 1984, 254-258.
- Singh, I. H. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J. virol.* , 66, 7049-7059.

- Skoging, U. V. (1996). Aromatic interactions define the binding of the alphavirus spike to its nucleocapsid. *Structure* , 15, 519-529.
- Smit, J. B. (2001). Deacylation of the transmembrane domains of Sindbis virus envelope glycoproteins E1 and E2 does not affect low-pH-induced viral membrane fusion activity. *FEBS Lett.* , 498, 57-61.
- Snyder JE, A. O. (2011). Rescue of infectious particles from preassembled alphavirus nucleocapsid cores. *J. Virol.* , 85, 5773-5781.
- Solignat, M. G. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *J. Virol.* , 393, 183-197.
- Sonawane, N. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* , 278, 44826-44831.
- Soonsawad, P. X. (2010). Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to Alphavirus budding. *J. Virol.* , 84, 11145-11151.
- Sourisseau, M. S.-B.-F. (2007). Characterization of reemergin Chikungunya virus. *PLoS Pathog.* , 3, e89.
- Spuul, P. B. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J. Virol.* , 84, 7543-7557.
- Strauss, J. S. (1990). Alphavirus proteinases. *Sem. Virol.* , 1, 391-562.
- Strauss, J. S. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* , 58, 491-562.
- Sudeep, A. P. (2008). Chikungunya: an overview. *J. Biosci.* , 33, 443-449.
- Tellinghuisen, T. H. (1999). In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in Escherichia coli. *J. Virol.* , 73, 5309-5319.
- Tiwari, M. P. (2009). Assessment of immunogenic potencial of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine.* , 27, 2513-2522.
- Tomar, S. H. (2006). Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J. Virol.* , 80, 9962-9969.
- Townson, H. N. (2008). Resurgence of Chikungunya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 102, 308-309.
- Tsetsarkin, K. M. (2009). Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of Chikungunya virus to Aedes albopictus and Ae. aegypti mosquitoes. *PLOS* , 4, 1-12.

- Tsetsarkin, K. V. (2007). A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* , 3, e201.
- Turell, M. M. (1992). Limited potential for mosquito transmission of a live, attenuated chikungunya virus vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 47, 98-103.
- Tzili, S. D.-S. (2004). A statistical-thermodynamic model of viral budding. *Biophys. J.* , 86, 2037-2048.
- Vanlandingham, D. T. (2005). Development and characterization of a double subgenomic Chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 35, 1162-1170.
- Vasiljeva, L. M. (2000). Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of nsP2. *J. Biol. Chem.* , 275, 17281-17287.
- Vicente, T. R. (2011). Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J. Invertebr. Pathol.* , 107.
- Vihinen, H. A. (2001). Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* , 276, 5745-5752.
- Volk, S. C. (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J. Virol.* , 84, 6497-6504.
- Voss, J. V.-B. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by x-ray crystallography. *Nature* , 468, 709-712.
- Wang, E. V. (2008). Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* , 26, 5030-5039.
- Wang, K. K. (1992). High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J. Virol.* , 66, 4992-5001.
- Wang, Y. S. (1991). Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* , 65, 985-988.
- Warner, R. L. (2008). Role of sindbis virus capsid protein region II in nucleocapsid core assembly and encapsidation of genomic RNA. *J. Virol.* , 82, 4461-4470.
- Yergolkar, P. T. (2006). Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg. Infect. Dis.* , 12, 1580-1583.

Índice de Tabelas e Figuras

Figura 4.1 Representação esquemática do virião de CHIKV. (A) Corte transversal mostrando, do interior para o exterior: nucleocápside composta pela proteína C com RNA genómico, no seu interior, invólucro lipídico e espículas de glicoproteínas transmembranares E1 e E2 ligadas às proteínas da nucleocápside (B). Simetria icosaédrica da nucleocápside T = 4 (C). B e C adaptados de *viralzone.expasy.org*. (C) Aspecto tridimensional do virião com espículas de trímeros de E1 e E2, adaptado de Voss *et al.*, 2010.2

Figura 1.5 Organização do genoma, genes e produtos de expressão de CHIKV. O genoma de CHIKV assemelha-se a um mRNA eucariótico dotado de 5'cap e cauda poli-A. Este possui duas ORFs, uma maior a 5' correspondente às proteínas não estruturais e outra, mais pequena a 3', correspondente às proteínas estruturais. Ambas dão origem a precursores poliproteicos após clivagem proteolítica por proteases virais e/ou celulares. Adaptado de Solignat *et al.*, 2009.3

Figura 1.6 A. Ciclo replicativo de CHIKV. Após ligação à célula hospedeira, o vírus é endocitado. Após fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, o genoma viral é libertado no citoplasma, e traduzido para dar origem às proteínas não estruturais (nsP1-4). Estas iniciam a replicação do genoma viral através da síntese de um RNA antígeno e, a partir deste, a transcrição do RNA subgenómico 26S. A tradução do RNA 26S dá origem à poliproteína estrutural C-pE2-6K-E1 que é processada em proteínas individuais. Após autoproteólise da cápside, as glicoproteínas sintetizadas em associação com a via secretória migram para a membrana celular, onde a associação com proteínas da cápside e genoma viral (nucleocápsides) induz a gemulação e libertação de partículas virais com invólucro. Adaptado de Solignat *et al.*, 2009. B. Esquema da poliproteína estrutural e sua inserção na membrana do retículo endoplasmático mostrando a posição das proteínas da cápside, E3, E2, 6k e E1. Adaptado de Li *et al.*, 2010.9

Figura 1.4 Distribuição global do vírus Chikungunya em 2007. Este vírus é endémico de países da África central e do sul, e epidémico no subcontinente Indiano e sudoeste Asiático. Com alguns casos importados registados pelo mundo, Itália e França já registaram

transmissões autóctones nos seus territórios. Adaptado de Powers e Logue, 2007. 14

Figura 1.5 (A) O vector *Aedes albopictus* sobrevive em ambientes temperados onde *Aedes aegypti* (B) não consegue sobreviver, tornando-o um veículo de doenças tropicais para os países ocidentais. Adaptado de Pialoux *et al.*, 2007. 16

Tabela 2.1 *Primers* utilizados em síntese de cDNA e amplificação por PCR da sequência nucleotídica correspondente à poliproteína estrutural de CHIKV. As sequências sublinhadas indicam locais de reconhecimento gerados para as enzimas de restrição SacI (GAGCTC) e NotI (GCGGCCGC). A caixa cinzenta indica a sequência Kozak canónica. 27

Tabela 2.2 Condições utilizadas na reacção de transcrição reversa de RNA de CHIKV. 27

Tabela 2.3 Condições utilizadas na 1ª reacção de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV a partir de cDNA. 28

Tabela 2.4 Condições utilizadas na 2ª reacção de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante da poliproteína estrutural de CHIKV a partir do produto da 1ª reacção de PCR. 28

Figura 2.1 Mapa genómico do vector pLEXm. Adaptado de Aricescu *et al.*, 2006. 27

Figura 3.1 Separação em gel de 0,7% de agarose dos produtos da primeira reacção (A) e da segunda reacção (B) de *nested-PCR* para amplificação da sequência codificante das proteínas estruturais de CHIKV. Pistas 2-4 produtos resultantes de três reacções diferentes da primeira reacção. Pista 6 produto da segunda reacção. Pistas 1 e 5 marcador molecular Lambda DNA HindIII, *Fermentas*. 39

Figura 3.2 *Screening* de vectores pLEXm recombinantes em transformantes de *E. coli*. Como controlo foi migrado paralelamente o plasmídeo selvagem pLEXm. 39

Figura 3.3 Digestão com SacI e NotI de pLEXm (B), pLCHICKS28 (C), pLCHICKS45 (D), pLCHICKS62 (E), pLCHICKS67 (F), pLCHICKS69 (G) e pLCHICKS76 (H). (A) Marcador Lambda DNA Eco91I (BstEII), *Fermentas*. 40

Figura 3.4 Imagens de células HEK 293T (A) e células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pEGFP-delta (B) observadas em microscopia de fluorescência (ampliação 100x). 41

Figura 3.5 Imagens de imunofluorescência de células transfectadas com plasmídeos de expressão recombinantes. (A) Células HEK 293T, (B) células HEK 293T infectadas com CHIKV, (C) células HEK 293T transfectadas com pLEXm, e (C, D, E, F, G, H, I) com pLCHIKS28, pLCHIKS45, pLCHIKS62, pLCHIKS67, pLCHIKS69 e pLCHIKS76, respectivamente (ampliação 400x). Observam-se diferentes intensidades na emissão de fluorescência sendo esta concentrada na periferia celular.42

Figura 3.6 Imagens de imunofluorescência de células HEK 293T não permeabilizadas (A, B e C) e permeabilizadas (D, E e F) com detergente. (A e D) Células HEK 293T, (B e E) células HEK 293T infectadas com CHIKV, (C e F) células HEK 293T transfectadas com pLCHIKS45. Observa-se um aumento na emissão de fluorescência nas células permeabilizadas infectadas com vírus e transfectadas com pLCHIKS45, relativamente a preparações correspondentes não permeabilizadas. (Ampliação 400x) 42

Figura 3.7. Perfil electroforético de células HEK 293T infectadas com CHIKV (2) e transfectadas com pLEXm (3), pLCHIKS28 (4), pLCHIKS45 (5), pLCHIKS67 (6) e pLCHIKS76 (7). Observam um perfil de bandas típico nas células infectadas com CHIKV, bandas de 62kDa, 50kDa, ocorrendo variantes destas nos diferentes clones. Marcador de pesos moleculares (1) *ProSieve® Color Protein Marker #50552*. 44

Figura 3.8. Perfil electroforético de células HEK 293T infectadas com CHIKV (1), células HEK 293T (2) e células transfectadas com pLEXm (3), pLCHIKS28 (5), pLCHIKS45 (6), pLCHIKS62 (7), pLCHIKS67 (8), pLCHIKS69 (9) e pLCHIKS76 (10). Observa-se apenas uma banda viral de cerca de 49kDa nas células infectadas com CHIKV e células transfectadas com pLCHIKS67. Marcador de pesos moleculares (4) *ProSieve® Color Protein Marker #50550*.46

Figura 3.9 Células HEK 293T infectadas com CHIKV 24 horas pós infecção. A) Arranjo de vesículas membranares no citoplasma das células infectadas. B) partículas extracelulares de CHIKV (setas).47

Figura 3.10 Células HEK 293T transfectadas com o vector de expressão recombinante pLCHIKS67 às 48 horas pós transfecção. A) Arranjo de vesículas membranares no citoplasma das células transfectadas. B) VLPs extracelulares de CHIKV (setas).47